

宿主スプライシング因子Prp18によるインフルエンザウイルスRNA合成促進機構の解析

著者	水口 萌子
発行年	2017
学位授与大学	筑波大学 (University of Tsukuba)
学位授与年度	2016
報告番号	12102甲第8244号
URL	http://hdl.handle.net/2241/00147949

筑 波 大 学

博 士 （ 医 学 ） 学 位 論 文

宿主スプライシング因子 Prp18 による
インフルエンザウイルス RNA 合成促進機構の解析

2016

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

水口 萌子

目次

第一章 序論	4
第一節 概論	4
第一項 ウイルスの定義	4
第二項 本研究の目的と意義	5
第三項 略語表	6
第二節 インフルエンザウイルス概論	8
第一項 インフルエンザウイルスの構造と各ウイルス遺伝子の機能	8
第二項 インフルエンザウイルスゲノムの転写複製機構	11
第三節 分子シャペロン概論	12
第一項 分子シャペロンの概念と歴史	12
第二項 ウイルスゲノム複製と分子シャペロン	12
第四節 酵母内ウイルスレプリコン系	13
第一項 酵母の有用性	13
第二項 インフルエンザウイルスゲノム複製活性を指標にした宿主因子 のスクリーニング	13
第五節 本研究で用いた生化学および遺伝子工学実験法	15
第一項 細胞培養	16
第二項 ウイルス実験法	18
第三項 プラスミド構築法	21
第四項 大腸菌タンパク質発現系を用いたリコンビナントタンパク質精 製法	22
第五項 電気泳動法およびその検出法	25
第六項 GST プルダウン法	30
第七項 免疫沈降法	31

第八項	ウエスタンブロット 法	32
第九項	T7 RNA polymerase を用いたモデルウイルスゲノムの調製法	34
第十項	<i>in vitro</i> RNA 合成反応系	34
第十一項	ゲルシフトアッセイ	35
第十二項	siRNA を用いた遺伝子ノックダウン細胞作製法	36
第十三項	培養細胞からの RNA 抽出法	36
第十四項	RT および定量的 PCR 法	37
第二章	酵母ウイルスレプリコン系によりインフルエンザウイルスゲノム複製に 関わる宿主因子として同定された Prp18 の機能解析	38
第一節	概論	38
第一項	本研究の目的	38
第二項	Prp18 の特徴と機能	38
第三項	Prp18 の生物間のホモロジーについて	39
第二節	実験結果	40
第一項	Prp18 による試験管内ウイルス RNA 合成活性の促進	40
第二項	Prp18 ノックダウン細胞における感染性ウイルス粒子産生量お よびウイルス RNA 合成活性	41
第三項	siRNA 耐性 <i>Prp18</i> 遺伝子を用いたウイルス RNA 合成活性のレ スキュー試験	42
第四項	Prp18 と相互作用するウイルス因子の同定とその結合のウイル ス RNA 合成活性への影響	43
第五項	Prp18 はウイルス RNA 合成の伸長反応を促進する	45
第六項	Prp18 は分子シャペロンとして NP-RNA 複合体形成を促進する	46
第三節	考察および展望	47

第一項	インフルエンザウイルスゲノム複製と宿主細胞内スプライシング因子の関連性について	47
第二項	Prp18 とウイルスポリメラーゼの結合について	47
第三項	vRNP 複合体に作用する NP シャペロン	48
第四項	Prp18 モチーフについて	49
第五項	展望	50
	謝辞	51
	参考文献	52
	参考論文	
	本研究で用いたプライマー一覧表	

第一章 序論

第一節 概論

第一項 ウイルスの定義

1982 年、ロシア人微生物学者ディミトリ・イワノフスキーが、タバコモザイクウイルスを発見したことにより、ウイルスの存在が明らかになった。そして、アンドレ・ルヴォフによってウイルスの定義が以下のように定められた。

- 細胞内だけで増殖し、潜在的に病原性をもつ感染性の実体
- 核酸として DNA または RNA のいずれか一方を持つ
- 二分裂で増殖しない
- エネルギー産生系を欠く
- 宿主のリボソームをタンパク質合成に利用する

生物の定義は、未だ研究者間で定義づけが曖昧であるため明確に述べることは困難だが、ウイルスは自身のみでは増殖できず、宿主細胞に寄生することで増殖することから無生物であると定義されている。しかし近年、タンパク質翻訳に関わる遺伝子をウイルス自身がコードしている巨大ウイルスの存在が報告されており、研究者の間で繰り広げられる生物およびウイルスの定義に関する長い論争は、現在でも決着がついていない。

第二項 本研究の目的と意義

本研究では、インフルエンザウイルスゲノム複製に必須な細胞由来の因子（宿主因子）を同定し、その分子機構を解明することを目的としている。ウイルスは偏性細胞内寄生体であり、宿主細胞の生体システムを利用しなければならない。つまり、種々の宿主因子とウイルス因子間の相互作用が重要であると推測されるが、全容は未解明である。宿主因子とウイルス性因子との相互作用の分子機構を明らかにすることは、ウイルスの種特異性や病原性発現を理解することに繋がり、ウイルス学研究にとって非常に重要な課題である。

第三項 略語表

Ad	adenovirus
AIDS	acquired immunodeficiency syndrome
APS	ammonium peroxodisulfate
BMV	brome mosaic virus
BPB	bromophenol blue
CHX	cycloheximide
CIAP	calf intestine alkaline phosphatase
CPE	cytopathic effect
CRM1	chromosomal maintenance 1
cRNA	complementary RNA
CypH	cyclophilin H
FBS	fetal bovine serum
HA	hemagglutinin
hPrp18	human Prp18
IPTG	isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
LB	Luria-Bertani (Lysogeny) broth
MCM	minichromosome maintenance
M1	matrix protein 1
M2	matrix protein 2
MOI	multiplicity of infection
mRNA	messenger RNA
NLS	nuclear localization signal
NA	neuraminidase
NP	nucleoprotein
NS1	nonstructural protein 1
NS2	nonstructural protein 2
ORF	open reading frame
PA	polymerase acidic protein
PB1	polymerase basic protein 1
PB2	polymerase basic protein 2
PKR	protein kinase R

RNP	ribonucleoprotein
rpm	round per minute
PFU	plaque formation unit
Pol II	DNA-dependent RNA polymerase II
SDS	sodium dodecyl sulfate
snRNP	small nuclear ribonucleoprotein
SRA	steroid receptor activator RNA
SRAP	steroid receptor activator protein
TAE	tris acetate EDTA
TAF-I	template activating factor I
TEMED	N, N, N', N' -tetramethylethylenediamine
vRNA	viral RNA
MNase	micrococcal nuclease
XC	xylene cyanol

第二節 インフルエンザウイルス概論

第一項 インフルエンザウイルスの構造と各ウイルス遺伝子の機能

インフルエンザウイルスはオルソミクソウイルス科 (*orthomyxovirida*) に属する。この科に属するウイルスはそのゲノムとして 1 本鎖 RNA (vRNA) をもち、vRNA は mRNA の鋳型となるマイナス極性である。さらにゲノムが分節化しており、インフルエンザウイルスは A 型、B 型で 8 本、C 型で 7 本の RNA 分節を持つ。本項では毎年世界的大流行を引き起こす A 型インフルエンザウイルスについて概説する。

A 型インフルエンザウイルスは宿主細胞膜由来の脂質二重膜 (エンベロープ) からなるウイルス外被で囲まれた、直径 80~120 nm のエンベロープウイルスである (Figure 1)。外被には 3 量体のヘマグルチニン (HA) と 4 量体のノイラミニダーゼ (NA) がスパイク状に突出しており、さらに 4 量体のイオンチャンネル M2 がウイルス粒子膜を貫通して存在する。ウイルス粒子の内側は M1 によって裏打ちされ、その内部には 8 本のマイナス鎖 1 本鎖 RNA ゲノムが収納されており(1)、PB1、PB2、PA からなる RNA 依存性 RNA ポリメラーゼおよび NP がウイルスゲノムに結合して vRNP 複合体を形成している(2)。8 種類のウイルスゲノムは 12 種類のウイルスタンパク質をコードしている。第 1、第 2、第 3 分節は、それぞれ PB2、PB1、PA をコードしており、これら 3 種のサブユニットが会合してウイルス RNA ポリメラーゼ複合体を形成している。第 1 分節にコードされている PB2 には、宿主細胞由来のキャップ構造認識領域が存在する(3, 4)。第 2 分節にコードされている PB1 サブユニットは、RNA ウイルスの RNA ポリメラーゼに共通する 4 つのモチーフが存在し、RNA 合成の触媒サブユニットとして機能している(5)。PB1 の N 末端に PA の C 末端領域が結合し(6)、PB1 の C 末端領域に PB2 の N 末端領域が結合することで(7)、ウイルス RNA ポリメラーゼの 3 者複合体は形成されている。また、PB1 と異なる open reading frame (ORF) から発現する PB1-F2 は、ミトコンドリアに多く蓄積し、アポトーシスを誘導することが報告されている(8)。第 3 分節にコードされている PA サブユニットは、温度感受性変異株 *ts53* 株を用いた遺伝学的解析により複製反応に関与することが報告されており(9)、宿主因

子 minichromosome maintenance (MCM) 複合体と相互作用することで、伸長反応複合体の安定化に寄与していることが推測されている(10)。また、PA は転写開始反応でのエンドヌクレアーゼ活性にも関与する(11, 12)。近年、PA にコードされている新たなウイルスタンパク質として、PA-X が同定されている(13)。インフルエンザウイルスゲノムの複製反応は、PA-X が存在しなくても反応が進むため、現段階では、PA-X の機能は明らかになっていない。

第5分節にコードされるnucleoprotein (NP) は、vRNP複合体の主要タンパク質であり、約20塩基に一つの割合で配列非特異的にvRNAに結合する塩基性タンパク質である(14)。これまでに、NPの分子シャペロンとして、RAF-2p48/UAP56/BAT1/NPI-5およびTat-SF1が同定されている(15, 16)。RAF-2p48は、スプライシング反応第一段階においてATP依存的なスプライソソーム形成およびU2 snRNPとブランチポイントとの相互作用に必要な因子である。Tat-SF1は、U1、U2、U4、U5、U6 snRNAと相互作用するスプライシング因子として報告されているが、詳細な機能は未知である。インフルエンザウイルスゲノム合成において、RAF-2p48およびTat-SF1は、遊離型NPと相互作用し、裸のウイルスゲノムにNPをリクルートすることで、ウイルスRNA合成において鋳型活性を持つNP-RNA複合体形成を促進する(15, 16)。また、A型インフルエンザウイルス種間においてNPのタンパク質配列は90%のホモロジーであることから、抗ウイルス薬のターゲットとしても注目されている。

NP のアミノ酸残基 1～20 番目の領域は構造を持たない天然変性領域 (Disordered region) であると推測されている (Figure 2)。この領域には、vRNP の核内移行に関与する核局在化シグナル (NLS) が存在し(17, 18)、NLS を介した Importin α (19)および RAF-2p48 との結合部位であることが明らかになっている(15)。NP のリン酸化部位が複数同定されており、リン酸化することで NP-NP 間の結合が阻害され、多量体化が抑制され単量体になることが報告されている(20)。点変異を導入して単量体化した NP では、ウイルス RNA 合成が抑制されることが報告されており(21, 22)、RNA 合成を行うためには、NP はウイルスゲノム上でオリゴマーを形成する必要があると推測される。NP のアミノ酸配列を宿主動物種間で比較すると、由来する動物種によって保存性が異なることが報告されている(23)。また、ヒト由来のウイルス株にトリ型の NP を導入すると、哺乳動物でのウイルス増殖が抑制されることが報告されて

いる(24)。さらに、NP のリン酸化が動物種によって異なることや、核内・核外輸送に関わることも報告されており(18)、NP がインフルエンザウイルスの種特異性を決定している要因の一つである可能性が示唆されている。

第 4、第 6 分節はウイルス粒子膜に存在する 2 つの糖タンパク質 HA と NA をコードしている。HA は、宿主細胞表面のシアル酸を含む糖鎖をレセプターとして認識および吸着し、エンドソームでのウイルス膜とエンドソーム膜の融合に関与している(25)。ヒト型インフルエンザウイルスの HA は、ガラクトースが $\alpha 2-6$ 結合したシアル酸を認識するのに対し(26)、トリ型では $\alpha 2-3$ 結合を認識する。インフルエンザウイルスは主に上気道に感染するが、ヒトの上気道では、 $\alpha 2-3$ 結合のシアル酸の発現は低いため、HA のシアル酸特異性によって、鳥インフルエンザウイルスのヒトへの感染性が規定されると考えられている。NA はシアル酸分解能をもち、ウイルス粒子出芽の際に HA に結合したシアル酸を切り離すと考えられている。インフルエンザウイルス治療薬として用いられているオセルタミビル（タミフル）は、NA の機能を阻害することでウイルス増殖を抑制する。

第 7 分節からは M1 および M2 がスプライシングバリエーションとして発現する。M1 は、脂質二重膜のエンベロープを裏打ちし、膜表面タンパク質の足場として機能する。また、M1 はウイルスゲノムの転写・複製反応を抑制し(27)、複製された子孫 vRNP 複合体と結合して核外輸送を担う(28, 29)。M2 はプロトンチャネルとして機能する膜タンパク質であり、エンドソーム内に取り込まれたウイルス粒子内の pH を低下させ、vRNP を M1 から解離させることでウイルスゲノムの細胞内放出に関与している。

第 8 分節は、第 7 分節と同様にスプライシングによって NS1 および NS2 が産生される。これらの因子は、ウイルス粒子ではほとんど検出されない。NS1 には 2 本鎖 RNA 結合ドメインと、エフェクタードメインが存在し、宿主の PKR 活性を阻害することで、宿主生体防御を抑制すると考えられている(30)。また、NS2 は核外輸送因子である CRM1 を子孫 vRNP にリクルートするアダプター分子として機能し、vRNP の核外輸送に必須である(31)。

インフルエンザウイルスの各 RNA 分節の 5'末端と 3'末端は各分節間で高度に保存され、半相補的に結合したパンハンドル構造を取り、プロモーターとして機能する(32)。NP の vRNA への結合は、ウイルス RNA 合成の機能的な

鋳型形成に必要である(33, 34)。また、NP の結合した vRNA は効率よく核内へ輸送されることから、NP はウイルス粒子より細胞内に放出された vRNP の核移行にも関与する(35)。

第二項 インフルエンザウイルスゲノムの転写および複製機構

インフルエンザウイルスが宿主細胞に感染し、細胞質に放出された vRNP 複合体は核へ移行し、RNA 合成を開始する (Figure 3)。マイナス鎖 RNA ウイルスゲノムを鋳型として、ウイルス mRNA とウイルスゲノムの完全相補鎖である complementary RNA (cRNA) が合成される。インフルエンザウイルスゲノムの転写および複製は同一の vRNP を鋳型として行われるが、転写と複製反応のスイッチング機構は未解明である。転写反応では、インフルエンザウイルスポリメラーゼのサブユニットである PB2 が宿主 mRNA と結合し、キャップ構造を含む 5'末端 10 数塩基を PA サブユニットが切断し、これをプライマーとしてウイルス mRNA が合成される。伸長反応後、鋳型鎖の 5'末端から 15~22 塩基内側に存在する U 残基が連続した領域でポリメラーゼが鋳型上を滑り、ポリ A 鎖が付加される(36)。

複製反応は 2 段階の RNA 合成反応によってプライマー非依存的に行われる。第 1 段階は、vRNA から相補鎖である cRNA を合成する過程であり、第 2 段階は、cRNA を鋳型にして子孫 vRNA を増幅する過程である。近年、cRNA から vRNA の合成反応に必須な宿主因子として、pp32 および APRIL が同定されている(37)。

第三節 分子シャペロン概論

第一項 分子シャペロンの概念と歴史

シャペロン (Chaperone) とは、フランス語では社交界デビューする若い令嬢を介助する付添人のことを指す。分子生物学分野においては、生体高分子が機能を発揮するための高次構造を形成するために、介助役として機能するタンパク質因子のことを分子シャペロンと呼ぶ。

最初に分子シャペロンを発見したのは、宿主 DNA とヒストンの複合体であるヌクレオソームの形成を促進する酸性タンパク質、ヌクレオプラスミンの機能を同定した Laskey らである(38)。ヒストンタンパク質は塩基性アミノ酸に富んだタンパク質であり、負電荷を持つ DNA とそのまま混合しただけでは凝集し、機能的なヌクレオソームは形成されない。Laskey らは、アフリカツメガエルの卵から精製したヌクレオプラスミンがヒストンと相互作用し、ヒストンと DNA 間の余分な静電的相互作用を抑制することで、適切なヌクレオソーム形成を介助することを発見した。のちに、同じような機能を持つ細胞内タンパク質が次々に発見されたことから、Elis らによってこれらの現象をまとめた表現として、分子シャペロンという用語が提案された (Figure 4) (39)。

第二項 ウイルスゲノム複製と分子シャペロン

細胞内の核酸は裸のまま存在するのではなく、ヒストン等の塩基性タンパク質に結合することで小さくまとめられている。これは細胞に限ったことではなく、ウイルスゲノムにおいても同様である。

アデノウイルス (Ad) では、非感染 HeLa 細胞抽出液を用いたウイルスゲノム複製の試験管内再構成系により、Ad クロマチンの構造変換因子として Template Activating Factor (TAF) - I、TAF-II/NAP-1、TAF-III/nucleophosmin/B23 が同定された(40-44)。これらの TAF ファミリーは、ヒストンシャペロンとしても機能し、DNA からのヒストンの脱着を制御することで宿主遺伝子発現に関与している(45, 46)。

一方、インフルエンザウイルスを含む、RNA をゲノムとしてもつウイルス

では、クロマチン構造とは異なり、裸のウイルスゲノム RNA では鋳型として用いられず、RNA 結合タンパク質である NP が数珠状に結合した NP-RNA 複合体が鋳型として利用される。しかし、NP はヒストンと同様に塩基性アミノ酸で構成されたタンパク質であることから、NP と核酸をただ混合しただけでは凝集体を形成しやすい。RAF-2p48 および Tat-SF1 は NP シャペロンとして機能することで、機能的な NP-RNA 複合体を形成する宿主因子である。

第四節 酵母内ウイルスレプリコン系

第一項 酵母の有用性

酵母は、高等真核細胞との類似性が高く、遺伝学的手法が確立されていることから、真核細胞のモデルとして非常に有用である。ウイルス研究においても、酵母を用いて遺伝学的に宿主因子を同定した例が多数ある。RNA ウイルスのうち、初めて酵母内でウイルスゲノム複製が再構成されたのは、植物プラス鎖 RNA ウイルスの Brome mosaic virus (BMV) である(47)。また、後天性免疫不全症候群 (AIDS) の原因ウイルスである HIV-1 のウイルス粒子形成に必須な Gag タンパク質を酵母細胞内で発現させ、遺伝学的にウイルス様粒子の産生機構を解析することでウイルス粒子形成に関与する宿主因子が同定されている(48)。現在、酵母遺伝子の欠損株ライブラリーが市販されており、容易に遺伝子欠損株を入手することが可能である。

第二項 インフルエンザウイルスゲノム複製活性を指標にした宿主因子のスクリーニング

これまでに、Naito らにより、酵母内インフルエンザウイルスゲノムレプリコン系の構築が行われ(16)、必須遺伝子を除く、4,775 個の酵母遺伝子の一つずつ欠損した Yeast single-gene deletion library (Open Biosystems 社) を用いて、網羅的にウイルス RNA 合成に関与する宿主因子の同定が進められた。このアッセイ系では、スフェロプラスト化した酵母に、精製 vRNP を PEG 存在下で導入することで、酵母細胞内でウイルス RNA 合成を再構成している。

その結果、スプライシング関連因子である CUS2（ヒトホモログ：Tat-SF1）および pre-mRNA processing factor 18:Prp18 の欠損株において、顕著なウイルス RNA 合成活性の低下が観察された。Tat-SF1 についてはすでに解析が進められ、ウイルス RNA 合成活性の促進に関与する NP シャペロンとして機能することが明らかになっている(16)。本研究では、Tat-SF1 と同様に、酵母とヒト間で保存され、酵母内でウイルス RNA 合成に必要である Prp18 の機能解析を行った。

第五節 本研究で用いた生化学および遺伝子工学実験法

Molecular cloning a laboratory manual Third edition (Joseph Sambrook, David W. Russell, Cold Spring Harbor Laboratory press)を参照した。その他は、研究室の一般的プロトコールに従った。パーセント表示は特に表示がない場合、全量に対する容量パーセントとする。

・試薬類の品質

特に注記のない限り、ナカライテスク社及び和光純薬社の生化学用または分子生物学用特級品を使用した。

・保存方法

調製した試薬類は各試薬の特性に準じて室温、4°C、-30°C 及び-80°C で保存した。変性、変質を防ぐため、オートクレーブ装置 (TOMY) を用いた 121°C、20 分間の高圧蒸気滅菌、もしくは孔径 0.2 μm または 0.45 μm のフィルター (Millipore) を用いた濾過滅菌を行った。

・蒸留水の調製

特に注記のない限り、実験用水は超純水製造装置 (Millipore) を用いて作られた 18.3 M Ω の超純水を高圧蒸気滅菌したものを実験に用いた。

第一項 細胞培養

試薬

- 25x PBS (-)

NaCl	200 g
KCl	5 g
Na ₂ HPO ₄	36 g
KH ₂ HPO ₄	6 g
超純水	up to 1000 ml

オートクレーブ後、室温保存

- PBS

25x PBS (-)	20 ml
超純水	up to 500 ml

オートクレーブ後、室温保存

- Trypsin-EDTA

PBS (-)	40 ml
5% EDTA	1 ml
0.25% Trypsin	10 ml

4°C 保存

- MEM 細胞増殖培地

MEM (日水)	4.7 g
超純水	up to 500 ml
3% Glutamine	5 ml
FBS (Fetal Bovine Serum)	50 ml

adjust the pH to 7~8

オートクレーブ後、4°C 保存

※Glutamine と FBS はオートクレーブで滅菌後添加した。

● DMEM 細胞増殖培地

DMEM (日水)	4.75 g
超純水	up to 500 ml
3% Glutamine	10 ml
FBS (Fetal Bovine Serum)	50 ml
adjust the pH to 7~8	

オートクレーブ後、4°C 保存

※Glutamine と FBS はオートクレーブで滅菌後添加した。

➤ MDCK 細胞とHeLa 細胞

MEM 増殖培地で培養し、MDCK細胞はおよびHeLa細胞は3日に1回、1/5量の継代を行った。

ここではΦ 10 cm ディッシュを用いた継代について説明する。およそ70~80% confluent な状態に細胞が増殖したものを PBS (-) で洗浄後 1 ml の Trypsin-EDTA 溶液を添加し、37°C で MDCK は約 15 分間、HeLa 細胞は約 5 分間保温して十分に剥がした。剥がした細胞に 4 ml の MEM 増殖培地を加え 1000 rpm で 2~3 分間遠心し、上清を除去した後に、MEM 増殖培地を適量加え懸濁し、新しいΦ 10 cm ディッシュに植え継いだ。

➤ 293T 細胞

DMEM 増殖培地で培養し、2 日に 1 回、1/10 量の継代を MDCK および HeLa 細胞と同様の手法で行った。

第二項 ウイルス実験法

➤ 発育鶏卵ウイルス増殖法

100 μ l の種ウイルス ($10^3 \sim 10^4$ PFU/ml) を、ツベルクリン用注射器 (テルモ) を用いて鶏 10 日卵 (神奈川県養鶏経済農業協同組合連合会) に気室から血管をさけて接種した。針穴をマニキュアでふさぎ、孵卵器で 35.5°C で 48 時間培養した。 4°C の低温室に一晩おいた後、10 ml のデスポーザブル注射筒 (テルモ) と 18 G 注射針 (テルモ) を用いて無菌的に漿尿液を回収した。この方法により、鶏卵 1 個からおおよそ $10^7 \sim 10^8$ PFU/ml のウイルス液 10~15 ml が得られた。

ウイルス感染法

試薬

- Maintenance medium

10x MEM	10 ml
3% Glutamine	1 ml
10% BSA	1 ml
100x MEM vitamin solution (Gibco BRL)	1 ml
超純水	up to 100 ml
adjust the pH to 8.0	
用時調製	

増殖培地で培養した細胞を、 37°C の MEM (-) で洗浄した。MEM (-) をアスピレーターで十分除去し、Maintenance medium で適当に希釈したウイルス溶液を加えて、 37°C で 1 時間培養した。その後、MEM (-) で細胞を洗浄し、MEM (-) もしくは Maintenance medium を添加し培養を行った。

➤ プラークアッセイ法

試薬

● 10% BSA 溶液

BSA fraction V 10 g

PBS (-) up to 100 ml

濾過滅菌後、10 ml ずつ分注し-30°C 保存

● 1.6% Agarose

Agarose (SIGMA) 1.6 g

超純水 up to 100 ml

オートクレーブ後、室温保存

● 2x Maintenance medium (Φ 3.5 cm dish あたり)

10x MEM 0.3 ml

3% Glutamine 0.03 ml

10% BSA 溶液 0.03 ml

100x MEM vitamin solution 0.03 ml

用時調製

● 0.25% Trypsin 溶液

Trypsin 0.125 g

PBS (-) up to 50 ml

濾過滅菌後、100 µl ずつ分注して-30°C 保存

● 0.5% Amide Black 染色液

Amide black 10B 1 g

Acetic acid 20 ml

Ethanol 90 ml

超純水 up to 200 ml

6 穴プレートに confluent な MDCK 細胞を準備し、ウイルスの各希釈溶液を感染させ、あらかじめ電子レンジで溶解して 45°C に保温した 1.6% Agarose

と等量の 2x Maintenance medium、1/2,400 量の 0.25% Trypsin 溶液を混ぜて 3 ml ずつウェルに注いだ。30 分間室温で静置して Agarose を固化し、プレートを反転した状態で 37°C で培養を行った。プラークが確認できたところでウェルに固定液（エタノール：酢酸＝1：1）溶液を加え、30 分間室温で放置し細胞の固定を行った。固定後、注意深く Agarose を取り除き、0.5% Amide black 染色液を注ぎ、2 時間程度の染色を行った。染色後、染色液を取り除き、水道水でよく洗浄し、乾燥させ、プラーク数を計測した。

➤ ウイルス粒子精製法

試薬

- PBS (+)
1x PBS(-)
0.5 M MgCl₂
1 mM CaCl₂

漿尿液を 15,000 *xg* で 15 分間遠心し、上清にポリエチレングリコール 6,000 を最終濃度 8% (wt/vol) になるように加え、4°C で 3 時間攪拌した。15,000 *xg* で 20 分間遠心した後、沈殿物を PBS (+) に懸濁して 4°C で一晩攪拌した。15,000 *xg* で 10 分間遠心した上清を回収後、沈殿物に PBS (+) を加え、loose potter タイプのホモジェナイザーで均一化し、15,000 *xg* で 10 分間遠心後、上清を回収した。得られた沈殿物に再度、同様の操作を行い、上清を回収した。これらの操作で得られた上清をまとめ、60%と 30% (wt/vol) ショ糖-PBS (+) 溶液を 5 ml と 15 ml ずつ積載した SW28 ローター (Beckman) 用遠心管にこの上清を重層した。25,000 rpm、1.5 時間、4°C のショ糖段階密度勾配遠心により、60%と 30%の境界面にウイルス粒子が回収され、そのウイルス粒子を PBS (+) で 5~10 倍希釈し、SW28 ローターを用いて、25,000 rpm、1.5 時間、4°C で再度、遠心分離した。得られた沈殿物を保存用緩衝液 (10 mM Tris-HCl [pH7.4]、20% Glycerol、1 mM DTT) に懸濁して-80°C で保存した。

➤ インフルエンザウイルスRNP 複合体 (vRNP) 精製法

試薬

- 2x Solubilization buffer
200 mM Tris-HCl (pH 7.9)
300 mM NaCl
10 mM MgCl₂
2% Triton X-100
2% (wt/vol) Lysolecithin
10 mM DTT
10% Glycerol

300 µl の精製ウイルス粒子を等量の 2x Solubilization buffer と混合して、30°C、10 分間静置した。SW55Ti ローター (Beckman) 用の遠心管に 30 - 60% (vol/vol) グリセロールを含む直線密度勾配 (100 mM Tris-HCl [pH 7.9]、150 mM NaCl、1 mM DTT) を作製し、可溶化した精製ウイルス粒子を重層した。45,000 rpm、5 時間、4°C で遠心分離後、450 µl ずつ分画し、SDS-PAGE と CBB 染色法を用いて vRNP 回収画分を検出し、この画分を分注後、-80°C で保存した。

第三項 プラスミド構築法

➤ 培養細胞内発現プラスミド

- pCAGGS-P7-human Prp18 (hPrp18) -Myc

HeLa 細胞から抽出した Total RNA より、Oligo dT プライマーを用いて逆転写反応を行い、cDNA ライブラリーを得た。この cDNA ライブラリーを元に、hPrp18 for3 および hPrp18 rev2 をプライマーとし、hPrp18 の DNA 断片を PCR により増幅した。hPrp18 の cDNA 断片を鋳型として、さらに T4 polynucleotide kinase (TOYOBO) で 5'末端をリン酸化処理した hPrp18 for3 および未処理の Myc2 rev をプライマーとして hPrp18 の DNA 断片を PCR で増幅した。さらにこの PCR 断片を *NotI* で消化した。ベクターは、pCAGGS-

P7 を *NotI* と *EcoRV* で消化後、CIAP [Alkaline Phosphatase (Calfe intestine)] (TaKaRa)により脱リン酸化処理し、Ligation high (TOYOBO)と混ぜて pCAGGS-P7-hPrp18-Myc を構築した。

➤ 大腸菌内発現プラスミド

● pGEX6p-1-hPrp18

HeLa 細胞より抽出した Total RNA より、Oligo dT プライマーを用いて逆転写反応を行い、cDNA ライブラリーを得た。hPrp18 の cDNA 断片をさらに T4 polynucleotide kinase (TOYOBO)で 5'末端をリン酸化処理した hPrp18 for および hPrp18 rev をプライマーとして hPrp18 の DNA 断片を PCR で増幅した。あらかじめ *SmaI* (TOYOBO) で消化後、CIAP により脱リン酸化処理済みの pGEX6p-1 と、Ligation high を持ちいて pGEX6p-1-hPrp18 を構築した。

第四項 大腸菌タンパク質発現系を用いたリコンビナントタンパク質精製法

試薬

● LB 液体培地 (L-Broth)

Bacto tryptone	5 g
Yeast extract	2.5 g
NaCl	5 g

超純水で 500 ml にメスアップし、オートクレーブ滅菌後、室温で保存した。必要に応じて、終濃度 100 µg/ml になるように 100 mg/ml アンピシリン溶液を添加した。

● LB 寒天培地

Bacto tryptone	5 g
Yeast extract	2.5 g
NaCl	5 g
Agar	5 g

超純水で 500 ml にメスアップし、オートクレーブ滅菌後、50°C 程度まで冷ました培地に、必要に応じて、終濃度 100 µg/ml になるように 100 mg/ml アンピシリン溶液を添加し、よく攪拌した。その後、プラスチックプレートに適当量流し込み、固まるまで室温で静置した。その後 4°C で保存した。

- アンピシリン溶液 (Final 100 mg/ml)

Ampicilin sodium salt	5 g
-----------------------	-----

超純水で 50 ml にメスアップし、フィルターでろ過後、-30°C で保存した。

- IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside) 溶液 (Final 200 µg/ml)

Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside	2 g
-------------------------------------	-----

超純水で 10 ml にメスアップし、フィルターでろ過後、-30°C で保存した。

- Lysis buffer

1 M Tris-HCl (pH 7.9)	750 µl (Final 50 mM)
5 M NaCl	450 µl (Final 150 mM)
10% Triton X-100	150 µl (Final 0.1%)

超純水で 15 ml にメスアップ後、室温に保存した。

- Wash buffer

1 M Tris-HCl (pH 7.9)	750 µl (Final 50 mM)
1 M MgCl ₂	75 µl (Final 5 mM)
5 M NaCl	300 µl (Final 100 mM)
80% Glycerol	1.9 µl (Final 10%)
14.2 M 2-Mercaptoethanol	5.3 µl (Final 5 mM)
10% NonidetP-40	150 µl (Final 0.1%)

超純水で 15 ml にメスアップ後、室温に保存した。

- Elution buffer

1 M Tris-HCl (pH 7.9)	1 ml (Final 20 mM)
5 M NaCl	1.5 ml (Final 150 mM)
80% Glycerol	12.5 ml (Final 20%)
Glutathione (Reduced Form, free acid	150 mg (Final 10 mM)

超純水で 40 ml にメスアップ後、約 100 μ l の 5 N NaOH を添加し pH8.0 に調製した。その後、超純水で 50 ml までメスアップし、室温に保存した。

- 脱染液

Methanol	30 ml
Acetic acid	10 ml

超純水で 100 ml にメスアップし、室温で保存した。

- 固定液

Methanol	10 ml
Glycerol	3 ml

超純水で 100 ml にメスアップし、室温で保存した。

- Dialysis buffer

0.5 M HEPES-NaOH (pH 7.9)	50 ml (Final 50 mM)
2.5 M KCl	20 ml (Final 50 mM)
Glycerol	100 ml (Final 20%)

超純水で 500 ml にメスアップし、4°C で保存した。

スモールスケール (LB 液体培地 5 ml 分) で増やした大腸菌を 250 ml の LB 液体培地に移し、OD₆₀₀=0.4~0.6 になるまで 37°C、150 rpm で振とうした。その後、氷上で大腸菌を冷却し、IPTG を終濃度 1 mM になるように添加後、再度振とうした (hPrp18 : 37°C、4~5 時間、NP : 18°C、一晚攪拌)。

第五項 電気泳動法およびその検出法

➤ アガロースゲル電気泳動法

試薬

● 50x TAE (Tris-Acetate-EDTA buffer)

Trizma Base	121 g
Acetic acid	28.5 ml
0.5 M EDTA	50 ml
超純水	up to 500 ml
室温保存	

● 1x TAE

50x TAE	20 ml
超純水	up to 1,000 ml
室温保存	

● 10 mg/ml エチジウムブロマイド溶液

Ethidium bromide	1 g
超純水	up to 100 ml
4°C で遮光保存	

● 6x アガロースゲルサンプルバッファー

Glycerol	15 ml
BPB (bromophenol blue)	適当量
XC (xylene cyanol)	適当量
超純水	up to 50 ml
室温保存	

➤ 1%アガロースゲル

2 g のアガロースに 50x TAE 4 ml を加え、全量が 200 ml になるように超純水を加えた。十分懸濁し、電子レンジで加熱してアガロースを完全に溶解させ

た。50°C 前後に冷却した所で、10 mg/ml エチジウムブロマイド溶液 10 µl を加え、すばやく攪拌して、アガロースゲル作製枠 (TAITEC) に注いだ。コームを挿し、アガロースが固まるまで静置した。固まったゲルは枠から取り外し、1x TAE に浸して 4°C で保存した。

➤ 泳動サンプルの調製と電気泳動

サンプルの1/6容量のアガロースゲルサンプルバッファーをサンプルに加えた。泳動槽に1x TAEを満たし、50 Vまたは100 VでBPB、XCの泳動度を目安にして適度な泳動を行い、UVトランスイルミネーター (ATTO) を用いてバンドの検出を行った。

➤ SDS (Sodium dodecyl sulfate) ポリアクリルアミドゲル電気泳動法

試薬

● Solution A

Acrylamide	145 g
<i>N,N'</i> -methylene-bis-acrylamide	5 g
超純水	up to 500 ml
濾過滅菌後、4°C で遮光保存	

● Solution B

Trizma Base	90.75 g
SDS	2 g
adjust the pH to 8.8	
超純水	up to 500 ml
濾過滅菌後、室温保存	

- Solution C

Trizma Base	30.3 g
SDS	2 g
adjust the pH to 6.8	
超純水	up to 500 ml
濾過滅菌後、室温保存	

- 10x SDS ポリアクリルアミドゲル泳動バッファー

Trizma Base	30.2 g
Glycine	144 g
SDS	10 g
超純水	up to 1000 ml
室温保存	

- 4x SDS ポリアクリルアミドゲルサンプルバッファー

Solution C	25 ml
Glycerol	20 ml
SDS	4 g
β -mercaptoethanol	2 ml
BPB 適当量	
超純水	up to 50 ml
濾過滅菌後、500 μ l ずつ分注して-30°C で保存	

➤ ゲルの作製

一例として、10% SDS-PAGEゲルの作製例を示す。MINI PROTEAN II電気泳動システム (BIO-RAD) を使用した。ガラス板を所定の方法に従って組み立てた後、10% Resolving gel (超純水 2.5 ml、Solution A 2.0ml、Solution B 1.5 ml) を調製し、50 μ lの10% APS (ammonium persulfate) 及び5 μ lのTEMED (*N,N,N',N'*tetramethylenediamine) を加えてすばやく攪拌した後、ゲル作製枠に注ぎ込んだ。さらに蒸留水を重層し、ゲルが固まるまで静置した。固化後、重層した超純水を除きStacking gel (超純水 2.7 ml、Solution A 1.0 ml、Solution C 1.25 ml) に50 μ lの10% APS及び5 μ lのTEMEDを加えて攪拌

後、Resolving gelの上に重層した。サンプルコームを挿入してゲルが固まるまで静置した。

➤ 泳動サンプルの調製

サンプルの 1/4 容量の 4x SDS ポリアクリルアミドゲルサンプルバッファーをサンプルに加え、95°C で 5 分間加熱した。

➤ 電気泳動

泳動槽にSDSポリアクリルアミドゲル泳動バッファー（超純水 720 ml、10x SDS ポリアクリルアミドゲル泳動バッファー 80 ml）を満たし、固化したゲルを所定の方法に従って泳動槽にセットした。ゲル1枚につき、Stacking gel 中は15 mA、Resolving gel中は30 mA で泳動した。

➤ 尿素変性ポリアクリルアミド電気泳動法

試薬

● 40% Acrylamide (acrylamide:*N,N'*methylene bisacrylamide=19:1)

Acrylamide	190 g
<i>N,N'</i> -methylene bisacrylamide	10 g
超純水	up to 500 ml
遮光して 4°C で保存	

● 10x TBE

Trizma Base	105 g
Boric acid	55 g
0.5 M EDTA	40 ml
超純水	up to 1,000 ml
室温保存	

➤ ゲルの作製

一例として10% Urea-PAGEゲルの作製例を示す。尿素12 gを適量の超純水

に溶解し、ゲルの濃度に応じた40% Acrylamide溶液と10x TBEを2.5 ml加え、全量を25 mlにした。250 μ lの10% APSと25 μ lのTEMEDを加え、スラブゲル作製枠に注いだ。コームを挿入し、固化するまで静置した。

➤ 泳動サンプルの調製

泳動サンプルはエタノール沈殿後、Formamide dye (80% Formamide, BPB および XC 適当量) に溶解して 95°C で 3 分間加熱後に急冷した。

➤ 電気泳動

固化したゲルを所定の泳動槽にセットし、バッファーとして1x TBE溶液を満たした。泳動は40~60 mAで行った。

➤ ポリアクリルアミド電気泳動法

ゲルの作製

ゲルの濃度に応じたSolution A溶液と10x TBEを2.5 ml加え、全量を25 mlにした。250 μ l の10% APSと25 μ lのTEMEDを加え、スラブゲル作製枠に注いだ。コームを挿入し、固化するまで静置した。

➤ 泳動サンプルの調製

泳動サンプルはエタノール沈殿後、1x アガロースゲルサンプルバッファーに溶解した。

➤ 電気泳動

固化したゲルを所定の泳動槽にセットし、バッファーとして1x TBE溶液を満たした。泳動は20~30 mAで行った。

第六項 GST プルダウン法

試薬

- Reaction and Binding buffer

0.5 M HEPES-NaOH (pH7.9)	1 ml (Final 50 mM)
2.5 M KCl	80 μ l (Final 20 mM)
1 M MgCl ₂	12 μ l (Final 1.2 mM)
1 M DTT	6 μ l (Final 0.6 mM)
10% NP-40	100 μ l (Final 0.1%)
超純水	up to 10 ml
- Wash buffer

0.5 M HEPES-NaOH (pH7.9)	1 ml (Final 50 mM)
5 M NaCl	80 μ l (Final 20 mM)
0.5 M EDTA	20 μ l (Final 1 mM)
10% NP-40	100 μ l (Final 0.1%)
超純水	up to 10 ml

GST-hPrp18 もしくは GST タンパク質を buffer で平衡化した glutathione-sepharose 4B 10 μ l (bed volume) と混ぜて固定した後に、他のサンプルを添加して 25°C、1 時間インキュベーションした。His-NP は、添加する前に、v53 mer RNA (第 9 項を参照) を混ぜて 25°C、1 時間インキュベーションした。さらに、このサンプルに MNase を添加して、25°C、1 時間インキュベーションした。その後、Wash buffer で三回洗浄し、2x SDS dye を添加後、98°C、3 min ボイルし、12.5% SDS-PAGE で展開した。その後、抗 His 抗体および抗 GST 抗体を用いたウエスタンブロッティングにより、GST-Prp18 タンパク質または His-NP タンパク質を検出した。

第七項 免疫沈降法

試薬

- IP buffer

1M Tris-HCl (pH 8.0)	800 μ l (Final 20 mM)
5 M NaCl	800 μ l (Final 100 mM)
2.5 M KCl	480 μ l (Final 30 mM)
0.5 M EDTA	80 μ l (Final 1 mM)
10% NP-40	400 μ l (Final 0.1%)
超純水	up to 40 ml

遺伝子導入された 293T 細胞を回収し、IP buffer を 350 μ l 加えて氷上で Amplitude 30 で 10 秒を 3 セット行い、細胞を超音波処理した。その後、15,000 rpm、4°C、10 分間遠心後、上清を回収し、マウス抗 Myc 抗体を加え 1 時間、4°C で緩やかに攪拌した。Protein A sepharose (GE) はあらかじめ BSA (Final 2%) を加えて一晩攪拌した。10 μ l (bed vol.) の Protein A sepharose を加えて 1 時間、4°C でさらに攪拌後、1,000 $\times g$ で 10 秒間遠心し、アガロースビーズを沈降させ、上清を除いた。IP buffer 中でアガロースビーズを 3 回洗浄し、10 μ l の 2x SDS dye を加え、煮沸後、10% SDS-PAGE を用いて免疫沈降物を展開した。ウエスタンブロット法は、ウサギ抗 PB1、PB2、PA 抗体およびマウス抗 Myc 抗体を用いて行った。

第八項 ウェスタンブロット 法

試薬

- Transfer buffer

Trizma Base	3 g
Glycine	14.4 g
Methanol	150 ml
超純水	up to 1,000 ml

用時調製

- 20x TBS

Trizma Base	60 g
NaCl	160 g
KCl	4 g
adjust the pH to 7.4	
超純水	up to 500 ml

室温保存

- TBS

20x TBS	25 ml
超純水	up to 500 ml

室温保存

- TBS-T

20x TBS	25 ml
Tween-20	0.5 g
超純水	up to 500 ml

室温保存

- Blot

Non-fat dry milk	25 g
20x TBS	25 ml
10% Sodium azide	500 μ l
超純水	up to 500 ml
4°C 保存	

- トランスファー

SDS-PAGE後、展開したタンパク質をゲルから Immobilon-P transfer membrane (Millipore)上にトランスファー装置 (BIO-RAD) を用いてトランスファーを行った (45 Vで30分間、次いで90 Vで60分間)。イモビロンフィルターはトランスファー前にメタノールに浸した。トランスファーされたフィルターはBlotに30分間ほど浸してから検出操作を行った。

- 検出操作

Blotで希釈した抗体溶液にフィルターを1時間浸し、TBS-Tで数回の洗浄を行った。次いで、TBSで3,000倍希釈したビオチン化二次抗体溶液に10分間浸した。反応後TBS-Tで数回の洗浄を行った。次に、TBSで3,000倍希釈したストレプトアビジン標識アルカリフォスファターゼ溶液もしくはストレプトアビジン標識ホースラディッシュペルオキシターゼ溶液に10分間浸し、反応後TBS-Tで数回の洗浄を行った。その後、アルカリフォスファターゼ、もしくはホースラディッシュペルオキシターゼそれぞれの発色法に従って発色を行った。

第九項 T7 RNA polymerase を用いたモデルインフルエンザウイルスゲノムの調製法

モデルインフルエンザウイルスゲノムは、A/PR/8/34 株の第 8 分節塩基配列を元に作製した。インフルエンザウイルスゲノムの転写複製に必要最小限のシグナルが各 RNA 分節の両末端に存在する。5'および 3'に存在する末端配列を結合させた、53 塩基の RNA をモデルウイルスゲノムとした(66)。目的の RNA 配列に相補的な鋳型 DNA を設計し、3'側に T7 RNA polymerase 認識配列を追加した DNA プライマー、および T7 RNA polymerase 認識配列と相補的な配列のプライマーを設計し、Ribo MAX Large Scale RNA Production System (Promega) を用いた RNA 合成を行った。合成された 53 塩基の RNA は、尿素変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動法で展開後、切り出し精製を行った。最終的に超純水に溶解させ、-80°C で保存した。

第十項 *in vitro* RNA 合成反応系

- 反応組成
 - 50 mM HEPES-NaOH (pH 7.9)
 - 3 mM MgCl₂
 - 50 mM KCl
 - 1.5 mM DTT
 - 500 μM each ATP, CTP, and UTP
 - 25 μM GTP
 - 5 μCi [α-³²P]GTP (3,000 Ci/mmol)
 - 4 U RNase inhibitor
 - 250 μM ApG dinucleotide primer or 200 ng globin mRNA primer
 - 35 ng 53 mer model template

53 塩基のマイナス極性(vRNA 鎖)のモデル鋳型(53 mer model template:5'-AGUAGAAACAAGGGUGUUUUUCAUAUCAUUUAAACUUCACCCUG

CUUUUGCU-3') を用いて、グリセロール密度勾配遠心法で分画した vRNP を酵素源として 30°C、1 時間反応を行った。また、反応後、フェノールクロロホルム抽出を行い、5 µg のグリコーゲンを追加してエタノール沈殿後、3 µl の Formamide dye に再溶解した。98°C で 3 分間変性後、急冷して、10%尿素変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動法で分離した。泳動後、ゲルを脱染液で脱尿素処理したのち乾燥させ、BAS2500 もしくはオートラジオグラフィーを用いて合成産物の検出を行った。

第十一項 ゲルシフトアッセイ

試薬

● Binding buffer

0.5 M HEPES-NaOH (pH 7.9)	100 µl (Final 50 mM)
2.5 M KCl	8 µl (Final 20 mM)
1 M MgCl ₂	1.2 µl (Final 1.2 mM)
1 M DTT	0.6 µl (Final 0.6 mM)
10% NP-40	10 µl (Final 0.1%)
超純水	up to 1 ml

組換え His-NP と GST-hPrp18 および放射性ラベルした人工インフルエンザウイルスゲノム v53 mer RNA を用いたゲルシフトアッセイにより、NP シャペロン活性を検討した。まず His-NP と GST-hPrp18 を結合させるために total 20 µl の反応液で 30°C、30 分インキュベーションした。その後、放射性ラベルした v53 mer RNA を混合し、さらに 30°C、30 分インキュベーションした。反応終了後、最終濃度 10%のグリセロールを混合し、0.6%アガロースゲル (0.5 x TBE) によって 50 V、4°C、3 時間展開した。展開後のゲルは、軽く水分を除いた後に乾燥し、イメージアナライザーTyphoon FLA 7000 (GE) により、組換えタンパク質-放射性ラベル v53 の移動度を観察した。

第十二項 siRNA を用いた遺伝子ノックダウン細胞作製法

遺伝子ノックダウンには、Stealth siRNA (Thermo Fisher Scientific) を用いた。また、ネガティブコントロールには、Stealth RNAi Negative Control Duplexes; low GC (Control siRNA) (Thermo Fisher Scientific) を使用した。

試薬

RNAi MAX (Life technologies)

OPTI-MEM (GIBCO)

一般的なプロトコールに従って行った。50 pmol の Stealth siRNA と RNAi MAX、および OPTI-MEM を混合し、室温で 5 分インキュベーションした。軽くピペッティング操作により攪拌し、40%から 50%の密度で播種されている細胞に添加し、37°C、72 時間インキュベーションし、その後の実験に用いた。

第十三項 培養細胞からの RNA 抽出法

➤ AGPC法

試薬

● Denature solution

Guanidine thiocyanate	18.9 g (Final 4 M)
Sodium citrate	0.3 g (Final 25 mM)
N-lauroylsarcosine	0.2 g (Final 0.5%)
超純水	up to 40 ml

細胞を回収し、300 μ l の Denature solution (0.7% β -メルカプトエタノール含有) を添加し、27ゲージのシリンジで細胞を破碎した。30 μ l の 2 M NaOAc (pH 4.0) を添加、攪拌後、300 μ l の水飽和フェノールを添加した。120 μ l の CHCl_3 /isoamyl alcohol (24 : 1) を添加して、氷上で15分間静置後、15,000

rpm、20分間、4°Cで遠心分離して上清を回収した。回収した上清に300 µlの2-propanolを添加し、-30°Cで静置後、15,000 rpm、10分間、4°Cで遠心し、RNAを沈殿させた。沈殿物を70%エタノールで2回洗浄後、超純水に溶解し、DNase I処理後、フェノールクロロホルム抽出、エタノール沈殿を行い、適当な量の超純水に再溶解した。

第十四項 RT および定量的 PCR 法

➤ 逆転写反応溶液

Total RNA 1 µg
10 pmol primer for vRNA detection
10 pmol primer for cRNA detection
10 pmol Oligo (dT)₂₀ for mRNA detection
0.5 mM dNTPs
5 U RNase inhibitor (TOYOBO)
2.5 U Rever Tra Ace (TOYOBO)
1 x RT buffer (TOYOBO)

➤ PCR反応溶液

RT product (diluted 1,000 times)
2 pmol each primer sets
Fast Start SYBR Green Master (Roche)

精製した total RNA に vRNA、cRNA、mRNA のそれぞれの RNA を検出するためのプライマーを加え 70°C で 5 分間変性させ、氷上で急冷した後、上記の反応条件で 42°C、1 時間、逆転写反応を行った。95°C、3 分加熱することで反応を停止させ、超純水で 1/1,000 希釈を行った。希釈した逆転写反応産物と、上記に示したプライマーセットを用いて、Thermal Dice Real Time System (TaKaRa) により定量的 PCR を行った。

第二章 酵母ウイルスレプリコン系によりインフルエンザウイルスゲノム複製に関わる宿主因子として同定された human Prp18 (hPrp18) の機能解析

第一節 概論

第一項 本研究の目的

近年、質量分析器を用いたオミックス解析によって、ウイルスタンパク質と相互作用する膨大な種類の宿主因子候補が報告されているが、その機能はほとんど明らかにされていない。Naito らが開発した酵母ウイルスレプリコン系では、ウイルス RNA 合成活性をもとに、活性を指標にした機能的な宿主因子のスクリーニングが可能である。この系を用いて、酵母細胞内にて顕著にウイルス RNA 合成活性が低下する遺伝子欠損として、Prp18 が同定された。本研究では、hPrp18 に着目し、その作用機序を明らかにすることを目的とした。

第二項 Prp18 の特徴と機能

スプライシング反応は、段階的に各 snRNP がスプライシングジャンクションに集積することで進行する。Prp4 および Prp18 は、それぞれプロリン異性化酵素である cyclophilin H (CypH) と安定な複合体を形成し、スプライソソームに取り込まれることが示されている (Figure 5) (49–52)。Prp18 は、N 末端側に Prp4 と相溶性が高い Splicing Factor Motif を持ち、可変なヘリックス構造で構成されている。CypH は、Prp18 の N 末端で結合する。CypH は塩基性アミノ酸に富んだタンパク質であり、Prp18 の N 末端は、極性アミノ酸で構成されていることから、CypH と Prp18 は主に静電的相互作用により結合している可能性が考えられる。Prp18 の C 末端側は、U5 snRNP および Slu7 と結合する Prp18 モチーフで構成されており、種間で高度に保存されている (53)。点変異を導入した U5 snRNA の発現プラスミドを酵母にトランスフェクションし、生育試験を行ったところ、U5 snRNA の A8 または U4 に点変異を導入した際に酵母の生育の抑制活性が示された (54)。このことから、U5 snRNA の A8 と U4 が、Prp18 と関与することが示唆されているが、直接的な

結合部位は明らかになっていない。

第三項 Prp18 の生物種間のホモロジーについて

ヒトと酵母の Prp18 のアミノ酸配列は類似アミノ酸への置換を含めると、62%である。特に、Prp18 モチーフは生物種間で高度に保存されている。また、近年 Steroid receptor RNA activator protein (SRAP) が Prp18 モチーフと類似した構造を持つことが明らかになった (Figure 6) (55, 56)。

第二節 実験結果

第一項 hPrp18 による試験管内ウイルス RNA 合成活性の促進

Naito らによる遺伝子欠損酵母株を用いたスクリーニング実験により、酵母細胞内においてインフルエンザウイルス RNA 合成活性効果を持つ宿主因子として Prp18 が同定された。そこで、試験管内再構成系を用いて、hPrp18 によるウイルス RNA 合成活性の促進効果について検討した (Figure 7)。大腸菌発現系により組換え GST-hPrp18 を精製した (Figure 7A)。試験管内再構成系では、酵素源として精製ウイルス粒子から調製した vRNP 複合体を用い、新規合成鎖を $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ で放射性標識することでイメージアナライザーにより検出した (Figure 7B)。鋳型には、ウイルスゲノムのプロモーター領域を含む 53 塩基のモデルウイルスゲノム (v53) を用い、プライマーとして ApG ジヌクレオチドを添加することで、転写反応における宿主 mRNA のキャップ構造との結合やエンドヌクレアーゼ活性の影響を排除した RNA 合成活性のみを検出した。その結果、ネガティブコントロールとして用いた GST と比較して (lanes 2-4)、vRNP 由来の長鎖ウイルスゲノムを鋳型とした RNA 合成産物および v53 を鋳型として得られた RNA 合成産物が、GST-hPrp18 の量依存的に増加することが明らかになった (lanes 5-7)。この結果から、hPrp18 は vRNP 複合体と相互作用して、ウイルス RNA 合成活性を促進すると推測された。

第二項 hPrp18 ノックダウン細胞における感染性ウイルス粒子産生量およびウイルス RNA 合成活性

次に、哺乳類細胞由来の HeLa 細胞を用いた感染実験により、hPrp18 のウイルス RNA 合成活性に対する影響を検討した (Figure 8)。hPrp18 遺伝子に対する Stealth siRNA をトランスフェクションし、hPrp18 タンパク質の発現量をウエスタンブロット法で確認したところ、siRNA negative control low GC (Thermo Fisher Scientific) をトランスフェクションしたネガティブコントロール細胞 (以下、ネガティブコントロール) と比較して 10%以下に低下していた (Figure 8A)。トリパンプブルー染色法により hPrp18 ノックダウン細胞の生存率を評価したところ (Figure 8B)、生存率は約 90%であり、ネガティブコントロールと同等であった (Figure 8B)。この結果は、これまでの報告と合致しており、hPrp18 は細胞の生存にとって必須の因子ではないと考えられる (52, 57)。次に、hPrp18 ノックダウンの感染性ウイルス粒子産生量への影響を検討した (Figure 8C)。hPrp18 ノックダウン細胞に MOI=0.01 で PR8 株を感染させ、感染後 12、24、36、48、60、72 時間の培養上清を回収し、ブランクアッセイ法により、感染性粒子数を測定した。その結果、hPrp18 ノックダウン細胞では、感染性粒子の産生量はネガティブコントロールの 10%以下に低下した (Figure 8C)。続いて、hPrp18 ノックダウン細胞を用いて PR8 株を MOI=3 で感染させ、ウイルスタンパク質発現量 (Figure 8D) およびウイルス RNA 蓄積量を検討した (Figure 8E)。ネガティブコントロールと比較して、感染 3、5、7 時間後において NP およびウイルスポリメラーゼの発現量が約 40%に低下した (Figure 8D)。また、前期遺伝子として PA (segment 3)、初期遺伝子として NP (segment 5)、後期遺伝子として M1 (segment 7) の vRNA、cRNA、および mRNA 量を定量 RT-PCR 法により検出したところ (Figure 8E)、いずれのウイルス RNA においてもネガティブコントロールと比較して RNA 蓄積量が低下した。このことから、ウイルス遺伝子の発現時期に関わらず、hPrp18 はウイルス RNA 合成活性の促進に関与することが推測された。また、hPrp18 は、宿主細胞内でスプライシング因子として機能することから、hPrp18 ノックダウンにより、ウイルス遺伝子のスプライシングが低下する可能性が考えられる。そこで、スプライシングにより発現する M1 および M2

mRNA の蓄積量を測定したところ (Figure 8F, G)、Figure 7E と同様に、*M1* および *M2* mRNA 量は、コントロールと比較して約 30%から 40%に低下していた (Figure 8G)。一方、*M1* mRNA あたりの *M2* mRNA の比率は、ネガティブコントロールの約 80%に低下するのみであり (Figure 8G)、本実験条件では、hPrp18 ノックダウンによるスプライシング活性への影響は低いと考えられる。

第三項 siRNA 耐性 *hPrp18* 遺伝子を用いたウイルス RNA 合成活性のレスキュー試験

ウイルス mRNA は、ウイルス粒子より持ち込まれた vRNP(incoming vRNP) および新規に複製された子孫 vRNP から転写されるため、複製量と協調して増加する。次に、hPrp18 の転写活性への影響を検討するため、タンパク質合成阻害剤である Cycloheximide (CHX) を添加して新規タンパク質合成を阻害することで、子孫 vRNP の形成を阻害し、incoming vRNP からの複製非依存的な転写活性について検討した。hPrp18 ノックダウン細胞に、CHX 存在下で PR8 株を MOI=3 で感染させ、感染 4 時間後に細胞を回収し、Total RNA を抽出した。次いで、Oligo dT プライマーを用いて逆転写反応を行い、定量的 RT-PCR により *NP* mRNA 量を検出した (Figure 9A)。その結果、ネガティブコントロールと比較して、Prp18 ノックダウン細胞では *NP* mRNA 合成量が約 20%まで低下した (lane 4)。また、silent mutation を導入し、hPrp18 の siRNA に認識されない *hPrp18* 遺伝子を作製し (rhPrp18-myc)、Prp18 ノックダウン細胞で発現することで、レスキュー試験を行った (Figure 9 A, B)。その結果、rhPrp18-myc を過剰発現させることで、*NP* mRNA 量はコントロールの約 70%まで回復した (lane 5)。その際の内在性の hPrp18 および rhPrp18-myc の発現量を Figure 9C に示す。以上の結果から、hPrp18 はウイルス mRNA 合成に必要な宿主因子であることが示唆された。

第四項 hPrp18 と相互作用するウイルス因子の同定とその結合のウイルス RNA 合成活性への影響

次に、hPrp18 の標的となるウイルスタンパク質を明らかにするために免疫沈降法および GST プルダウンアッセイを行った (Figure 10)。まず、hPrp18-myc 過剰発現 293T 細胞に、感染操作を MOI=3 で行い、感染 6 時間後に細胞を回収した。その後、抗 myc 抗体を用いた免疫沈降実験を行った (Figure 10A)。免疫沈降産物は、10% SDS-PAGE で展開し、その後、抗ウイルスポリメラーゼ抗体、抗 NP 抗体、もしくは抗 myc 抗体を用いたウエスタンブロット法により各ウイルスタンパク質を検出した (Figure 10A)。その結果、hPrp18-myc は、NP とウイルスポリメラーゼサブユニット PB1、PB2、PA および NP に結合することが明らかになった (Figure 10A)。よって、hPrp18 は vRNP 複合体と結合していると考えられた。そこで、MNase 処理した精製 vRNP (mnRNP) を用いて、組換え GST-hPrp18 との結合を GST プルダウンアッセイにより検討した (Figure 10B)。MNase 処理により、vRNP 複合体のウイルスゲノムが分解され、遊離型 NP およびウイルスポリメラーゼを調製することができる。その結果、GST-hPrp18 は遊離型 NP およびウイルスポリメラーゼにそれぞれ結合することが明らかになった (Figure 10B)。しかし、ウイルスポリメラーゼと NP は相互作用することが報告されており、ウイルスポリメラーゼもしくは NP が Prp18 と間接的に結合している可能性が考えられる。そこで、大腸菌発現系より精製した His-NP および GST-hPrp18 タンパク質を用いて、GST プルダウンアッセイを行ったところ (Figure 10C)、GST-hPrp18 は量依存的に NP と結合し、hPrp18 は NP と直接的に結合していることが示唆された。

次に、GST-hPrp18 部分欠損変異体を作製し、ウイルスポリメラーゼおよび NP との結合に関与するドメインの同定および各部分欠損体の RNA 合成促進活性を検討した (Figure 11A)。各 hPrp18 欠損変異体が核内へ移行しているか確認するために、抗 GST 抗体を用いた免疫染色法を行った (Figure 11B)。コントロールに用いた GST-NLS は、C 末端側に核局在化シグナル (NLS) を付加したものである。その結果、各 hPrp18 欠損変異体はすべて核内に局在していた (Figure 11B)。次に、感染 6 時間後の hPrp18 欠損変異体を過剰発現

した細胞抽出液を用いて、GST プルダウンアッセイを行った (Figure 11C)。その結果、GST-hPrp18C1 および GST-hPrp18 Δ 71 はウイルスポリメラーゼと結合せず、NP のみ共沈降が観察された (Figure 11C)。また、GST-Prp18C2 においてウイルスポリメラーゼおよび NP 両者の共沈降は認められなかった。よって、Prp18 の 193~342 アミノ酸で構成されている Prp18 モチーフでは、NP のみと結合していることが明らかになった (Figure 11C)。次に大腸菌発現系により、GST、GST-Prp18WT、GST-Prp18C2、および GST-Prp18 Δ 71 タンパク質を調製し (Figure 11E)、試験管内 RNA 合成系により、各欠損変異体のウイルス RNA 合成促進活性を検討した (Figure 11E)。その結果、NP のみと相互作用する GST-Prp18 Δ 71 において GST-Prp18WT と同等の促進活性が観察された (Figure 11E)。このことから、Prp18 は NP を介してウイルス RNA 合成活性を促進していることが推測された。

次に、Prp18 の NP 結合部位を明らかにするために、さらに Prp18 の N 末端欠損変異体を作製し、GST プルダウンアッセイを行った (Figure 12)。これから Prp18 欠損変異体は、大腸菌で発現後、GST タグ精製および Mono Q カラム精製を行い、実験に用いた (Figure 12B, C)。その結果、GST-Prp18WT と GST-Prp18 Δ 43、GST-Prp18N1、GST-Prp18N2 が NP と共沈降することが明らかになった (Figure 12E)。そのうち、Prp18WT と Prp18 Δ 43 の NP に対する結合活性はほぼ同等であった (Figure 12E)。このことから、Prp18 は C 末端側だけでなく、N 末端側 1~79 番目のアミノ酸領域も NP との結合に必要と推測された。

第五項 hPrp18 はウイルス RNA 合成の伸長反応を促進する

ここまでの実験から、hPrp18 は NP を介してウイルス RNA 合成活性を促進することが示唆された。RNA 合成反応は、開始、プロモーターからの離脱および伸長反応、終結、鋳型からのポリメラーゼの解離および再利用の各素過程からなり、hPrp18 がどの素過程に関与しているのか明らかになっていない。そこで、試験管内 RNA 合成系を用いて、Prp18 によるウイルス RNA 合成の促進機構の詳細を検討した (Figure 13)。反応開始後、0、1、2、4 分で反応液を回収し、新規合成鎖を観察したところ、0~2 分後の合成産物では Prp18 を添加しても非添加時と大きな違いは認められなかったが、反応 4 分後に観察される 300 nt 以上の新規合成鎖では、Prp18 による顕著な合成促進が観察された (Figure 13A)。次に、制限伸長反応における Prp18 のウイルス RNA 合成促進活性を検討した (Figure 13B)。制限伸長反応では、UTP 非存在下で vRNP を酵素源としてウイルス RNA 合成を行うことで、ウイルスポリメラーゼは鋳型の最初のアデニン残基で伸長反応を停止し、12~19 nt の短鎖合成鎖を合成する。そのため、伸長反応による影響をほとんど無視することができ、制限伸長反応の産物量から開始反応効率を測定することが可能である。その結果、Prp18 を添加しても、短鎖合成産物量に違いは見られず、Prp18 は開始反応には関与しないことが明らかになった (Figure 13B)。

これまでの報告で、新規合成鎖が伸長反応と協調して RNP 複合体を形成せず、ウイルスゲノムと相補鎖を形成しつづけた場合、伸長反応が途中で阻害されることが明らかになっている(58)。そこで、新規合成鎖とウイルスゲノムの相補鎖の形成量を評価するため、一本鎖 RNA 特異的なヌクレアーゼである RNase T2 を用いて合成産物の切断を行った (Figure 13C, D)。試験管内 RNA 合成反応後、終濃度 50 mM EDTA を添加して反応を停止し、RNase T2 処理により、二本鎖 RNA を検出した。その結果、Prp18 非存在下では、RNA 合成産物は RNase T2 によりほとんど切断されないのに対し、Prp18 存在下で得られた RNA 合成産物は、300 nt 以上の長鎖合成産物でのみ、RNase T2 の量依存的に分解を受けることが明らかになった (Figure 13C, D)。よって、Prp18 を添加することにより、新規合成鎖は鋳型ウイルスゲノムから遊離し、一本鎖

の状態を保っていると推測される。これらの結果から、Prp18 は vRNP 上の NP に作用し、新規合成鎖とウイルスゲノムとの相補鎖形成を抑制することで伸長反応を促進する可能性が示唆された。

第六項 Prp18 は分子シャペロンとして NP-RNA 複合体形成を促進する

遊離型 NP は、分子シャペロン非存在下では、NP 同士もしくは RNA と凝集してしまい、適切な RNP 複合体を形成できない。そこで、Prp18 の分子シャペロン活性を評価するため、ゲルシフトアッセイにより NP-ウイルスゲノム複合体形成への影響を検討した (Figure 14)。大腸菌発現系より調製した His-NP と GST-Prp18 (Figure 14A)、および 5'末端を ^{32}P で放射性標識したモデルウイルスゲノム v53 を用いてゲルシフトアッセイを行った (Figure 14B)。Prp18 非存在下で 12.5 fmol から 200 fmol の His-NP に、放射性標識した v53 を添加した場合 (Figure 14B)、25 fmol 以上の His-NP で凝集体が検出された。そこで、12.5 fmol の His-NP に GST-Prp18 を混合し、次いで、放射性標識した v53 を添加し、NP-RNA 複合体を形成させた。その結果、GST-Prp18 の量依存的に NP-RNA 複合体形成が促進されていることが明らかになった (Figure 14C)。Figure 14D に、Image J を用いて定量したこの結果をグラフに示す。以上の結果から、GST-Prp18 は NP を裸の RNA にリクルートし、分子シャペロンとして NP-RNA 複合体形成を促進すると推測された。

一般的に、シャペロンの定義として、「複合体形成を促進し、自身は複合体に含まれない」という性質を持つ。そこで、Prp18 が NP-RNA 複合体と結合しているのか検討するため、組換えタンパク質を用いたゲルシフトアッセイを行った後、抗 NP 抗体または抗 Prp18 抗体を用いたウエスタンブロット法により、NP および Prp18 タンパク質を検出した (Figure 15)。その結果、NP-RNA 複合体の移動度は 0.26 であるのに対し、Prp18 は 0.33 であり、GST-Prp18 は NP-RNA 複合体に含まれていないことが明らかになった (Figure 15)。以上の結果から、Prp18 は NP-RNA 複合体形成を促進するシャペロン分子である可能性が示唆された。

第三節 考察および展望

Naito らの報告より、遺伝子欠損酵母ライブラリーを用いた酵母内インフルエンザウイルス RNA 合成系より、ウイルス RNA 合成を促進する宿主因子として、Prp18 が同定された。本研究では、生化学的および細胞生物学的手法により、Prp18 によるインフルエンザウイルス RNA 合成の促進機構の解明を目的とし実験を行った。

第一項 インフルエンザウイルスゲノム複製と宿主細胞内スプライシング因子の関連性について

細胞核内において、宿主 mRNA を転写する RNA ポリメラーゼ II は転写ファクトリーとよばれる巨大な転写複合体を形成していると考えられている。転写ファクトリーには、スプライシング関連因子も集積し、転写反応と協調してスプライシングが行われる。ウイルスポリメラーゼは、宿主の pre-mRNA をプライマーとして利用し、その転写反応は、転写ファクトリーで行われることが示唆されている(59–61)。また、NP の分子シャペロンとして機能し、ウイルス RNA 合成活性を促進する宿主因子として RAF-2p48 および Tat-SF1 が同定されている(15, 16)。Prp18 も含め、これらの宿主因子は細胞内ではスプライシング因子として機能する。したがって、インフルエンザウイルスは転写ファクトリーの宿主因子群をハイジャックして、効率よくウイルス RNA 合成反応に利用していることが示唆される。

第二項 Prp18 とウイルスポリメラーゼの結合について

Figure 10 より、Prp18 は NP およびウイルスポリメラーゼと結合することが示唆された。NP のみと結合する Prp18 部分欠損変異体を用いた試験管内 RNA 合成系の結果より (Figure 11)、Prp18 は NP を介してウイルス RNA 合成活性を促進していることが示唆された。これまでの報告から、ウイルスポリメラーゼ PB1 および PB2 が NP と相互作用することで、ウイルスポリメラー

ゼの構造が変化し、ウイルスポリメラーゼが複製型へと機能変換される可能性が推測されている(21, 62–65)。Prp18はNPとウイルスポリメラーゼの両者に結合することから、NPによるウイルスポリメラーゼの機能変換に関与している可能性が考えられる。また、vRNPもしくはmnRNPとGST-Prp18を用いたGSTプルダウンの実験結果から、GST-Prp18は遊離型ウイルスポリメラーゼと効率よく結合することが明らかになった (Figure 10B)。これまでに、ウイルスポリメラーゼに結合したNPとRNA-freeのNPが多量体を形成することで、新規合成鎖に効率的にNPがリクルートされると報告されている(66)。したがって、NPとウイルスポリメラーゼの結合を促進することで、Prp18は効率的な子孫vRNP複合体形成に関与している可能性も推測される。

第三項 vRNP複合体に作用するNPシャペロン

RAF-2p48はMCM複合体と協調して遊離型NPを新規合成鎖にリクルートし、ウイルスRNA合成活性を促進する(58)。また、RAF-2p48は、遊離型NPに作用するが、vRNP上のNPには結合しない。本研究で着目したPrp18は、vRNP複合体上のNPに作用し、新規合成鎖と鋳型ウイルスゲノムの相補鎖形成を抑制することで、伸長反応を促進することが明らかになった。よってこれまでに同定されたNPシャペロンとは異なる分子機構と推測される。近年、インフルエンザウイルスと類似した構造をもつブンヤウイルスのRNAポリメラーゼでは、伸長反応時に読み途中の十数塩基の鋳型鎖のみを活性中心に引き込むため、NPは鋳型鎖から離れることなく、スライドするだけであることが報告されている(67)。このことから、Prp18は鋳型鎖上でスライドしたNPを効率よく再配置することで伸長反応を促進している可能性が考えられる。

第四項 Prp18 モチーフについて

Prp18 モチーフと非常に類似性の高いモチーフを持つタンパク質として、Steroid receptor RNA activator protein (SRAP) が報告されている。ステロイド応答遺伝子の転写は、エストロゲン、グルココルチコイド、プロゲステロンなどのホルモンがステロイドホルモンレセプターに結合することで制御される。1999 年、ヒトプロゲステロンレセプターを bait とした yeast two-hybrid 法により、ステロイドレセプターに結合して転写活性を促進する因子の探索実験が行われた(68, 69)。その中で、SRAP が Steroid receptor RNA activator (SRA) の co-activator としてプロゲステロンの転写活性に関与することが明らかになった(68)。SRA 遺伝子には、三つのスプライシングバリエントが同定されており、そのうちの一つの翻訳産物が、SRAP である。同定された当初は、SRAP のアミノ酸配列から、C 末端は RNA recognition motif (RRM) であると予想されていた(70)。しかし近年、NMR により SRAP の C 末端側の構造を解析した結果、RRM 構造ではなく、むしろ Prp18 モチーフとの類似性が高いことが明らかになった(55)。SRAP の C 末端側は、5 つの α -helix で構成されている。Prp18 の helix D と helix E の間に挿入が存在するものの、SRAP と Prp18 は 5 つの α -helix で構成されたシンプルな構造を保存している。しかし、アミノ酸配列のホモロジーが低く、配列類似性から推測される生物学的意義は不明である。Prp18 はスプライシング第二反応において、Prp18 モチーフを介してスプライソソームと結合し、RNA-RNA 結合を安定化させることでスプライシング反応に寄与していることや、SRAP は SRA と結合してステロイドレセプターと相互作用することでホルモンの転写制御に関与していることから、共通した α -helix 構造は、特異的なタンパク質-タンパク質相互作用を介したマルチサブユニット複合体の形成に関与しているのかもしれない。

第五項 展望

人口増加、気候変動による感染体を保有する自然宿主の分布の変化、開発途上国等の未開発地の開拓や経済のグローバル化などに起因する新興・再興感染症の課題は、つねに人類の脅威である。また、鳥インフルエンザや口蹄疫など、畜産に与える影響も甚大である。しかし、ワクチンや抗ウイルス薬の開発に成功している感染症はごく一部であり、具体的な対策がないのが現状である。現在、タンパク質間相互作用部位を標的とした創薬設計も可能になりつつあり、ウイルス増殖に必須な宿主因子を同定し、ウイルス因子との相互作用を制御することで新たな抗ウイルス薬を開発する試みも始まりつつある。そのためには、さらなるウイルス増殖に必須な宿主因子の同定とその作用機構の理解が必須である。

謝辞

本研究を行うにあたり、ウイルス学的手法や生化学的手法の博識だけでなく、研究と教育に対する姿勢を、厳しくも優しい御指導と御援助を賜りました、筑波大学 学長（前筑波大学大学院 人間総合科学研究科 教授） 永田 恭介 先生に深く感謝致します。

本研究の前半は、当研究室出身の内藤 忠相 助教（現：川崎医科大学 微生物学研究室）、加藤 有香 研究員（現：岡山大学 生体機能分子設計学研究室）、および当研究室所属の杉山 賢司 研究員の実験結果に基づいて行われたものです。貴重な実験材料を分与していただき、また有意義な御助言を賜り、深く感謝の意を表します。

また、多大な御指導と御助言および精神的に支えて下さいました筑波大学大学院 医学医療系 奥脇 暢 准教授、竹内 薫 准教授（現：環境微生物学研究室）、斎藤 祥子 助教、加藤 広介 助教、川口 敦史 助教、村野 健作 助教（現：慶應義塾大学 分子生物學研究室）、Ho Kiong 助教（寄生虫分子生物學研究室）、麻布大学 森田 重光 先生（現：環境省大臣官房）に深く感謝致します。そして、研究面および生活面で支えて下さいました、感染生物学 分子ウイルス学研究室のメンバーの皆様に、深く感謝の意を表します。

最後に、長い学生生活を、経済的に、また精神的にも援助し続けてくれた家族、および叔父の水口 光弘（故）さん、叔母の小高 絵都子さん、その他親族の皆様に、深く感謝致します。

2016 年 11 月 29 日

水口 萌子

参考文献

1. **Noda T, Sagara H, Yen A, Takada A, Kida H, Cheng RH, Kawaoka Y.** 2006. Architecture of ribonucleoprotein complexes in influenza A virus particles. *Nature* **439**:490–492.
2. **Ye Q, Krug RM, Tao YJ.** 2006. The mechanism by which influenza A virus nucleoprotein forms oligomers and binds RNA. *Nature* **444**:1078–1082.
3. **Guilligay D, Tarendeau F, Resa-Infante P, Coloma R, Crepin T, Sehr P, Lewis J, Ruigrok RWH, Ortin J, Hart DJ, Cusack S.** 2008. The structural basis for cap binding by influenza virus polymerase subunit PB2. *Nat Struct Mol Biol* **15**:500–506.
4. **Li ML, Rao P, Krug RM.** 2001. The active sites of the influenza cap-dependent endonuclease are on different polymerase subunits. *EMBO J* **20**:2078–2086.
5. **Biswas SK, Nayak DP.** 1994. Mutational analysis of the conserved motifs of influenza A virus polymerase basic protein 1. *J Virol* **68**:1819–1826.
6. **Perez DR, Donis RO.** 2001. Functional analysis of PA binding by influenza A virus PB1: effects on polymerase activity and viral infectivity. *J Virol* **75**:8127–8136.
7. **Ohtsu Y, Honda Y, Sakata Y, Kato H, Toyoda T.** 2002. Fine mapping of the subunit binding sites of influenza virus RNA polymerase. *Microbiol Immunol* **46**:167–175.
8. **Chen W, Calvo PAA, Malide D, Gibbs J, Schubert U, Bacik I, Basta S, O'Neill R, Schickli J, Palese P, Henklein P, Bennink JRR, Yewdell JWW.** 2001. A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nat Med* **7**:1306–1312.
9. **Kawaguchi A, Naito T, Nagata K.** 2005. Involvement of Influenza Virus PA Subunit in Assembly of Functional RNA Polymerase Complexes. *Journal Virol* **79**:732–744.
10. **Kawaguchi A, Nagata K.** 2007. De novo replication of the influenza virus RNA genome is regulated by DNA replicative helicase, MCM. *EMBO J* **26**:4566–4575.
11. **Dias A, Bouvier D, Crepin T, McCarthy AA, Hart DJ, Baudin F, Cusack S,**

- Ruigrok RW.** 2009. The cap-snatching endonuclease of influenza virus polymerase resides in the PA subunit. *Nature* **458**:914–918.
12. **Yuan P, Bartlam M, Lou Z, Chen S, Zhou J, He X, Lv Z, Ge R, Li X, Deng T, Fodor E, Rao Z, Liu Y.** 2009. Crystal structure of an avian influenza polymerase PA(N) reveals an endonuclease active site. *Nature* **458**:909–913.
 13. **Jagger BW, Wise HM, Kash JC, Walters KA, Wills NM, Xiao YL, Dunfee RL, Schwartzman LM, Ozinsky A, Bell GL, Dalton RM, Lo A, Efstathiou S, Atkins JF, Firth AE, Taubenberger JK DP.** 2012. An overlapping protein-coding region in influenza A virus segment 3 modulates the host response. *Science* **337**:199–204.
 14. **Pons MW, Schulze IT, Hirst GK.** 1969. Isolation and characterization of the ribonucleoprotein of influenza virus. *Virology* **39**:250–259.
 15. **Momose F, Basler CF, Neill REO, Iwamatsu A, Palese P, Nagata K.** 2001. Cellular Splicing Factor RAF-2p48 / NPI-5 / BAT1 / UAP56 Interacts with the Influenza Virus Nucleoprotein and Enhances Viral RNA Synthesis. *J Virol* **75**:1899–1908.
 16. **Naito T, Kiyasu Y, Sugiyama K, Kimura A, Nakano R, Matsukage A, Nagata K.** 2007. An influenza virus replicon system in yeast identified Tat-SF1 as a stimulatory host factor for viral RNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:18235–18240.
 17. **Wang P, Palese P, O'Neill RE.** 1997. The NPI-1/NPI-3 (karyopherin alpha) binding site on the influenza a virus nucleoprotein NP is a nonconventional nuclear localization signal. *J Virol* **71**:1850–1856.
 18. **Neumann G, Castrucci MR, Kawaoka Y.** 1997. Nuclear import and export of influenza virus nucleoprotein. *J Virol* **71**:9690–9700.
 19. **Görlich D, Prehn S, Laskey RA, Hartmann E.** 1994. Isolation of a protein that is essential for the first step of nuclear protein import. *Cell* **79**:767–778.
 20. **Mondal A, Potts GK, Dawson AR, Coon JJ, Mehle A.** 2015. Phosphorylation at the Homotypic Interface Regulates Nucleoprotein Oligomerization and Assembly of the Influenza Virus Replication Machinery. *PLoS Pathog* **11**:1–24.
 21. **Mena I, Jambrina E, Albo C, Perales B, Ortin J, Arrese M, Vallejo D, Portela A.** 1999. Mutational analysis of influenza A virus nucleoprotein:

- identification of mutations that affect RNA replication. *J Virol* **73**:1186–1194.
22. **Elton D, Medcalf L, Bishop K, Harrison D, Digard P.** 1999. Identification of amino acid residues of influenza virus nucleoprotein essential for RNA binding. *J Virol* **73**:7357–7367.
 23. **Gorman OT, Bean WJ, Kawaoka Y, Donatelli I, Guo YJ, Webster RG.** 1991. Evolution of influenza A virus nucleoprotein genes: implications for the origins of H1N1 human and classical swine viruses. *J Virol* **65**:3704–3714.
 24. **Snyder MH, Buckler-White AJ, London WT, Tierney EL, Murphy BR.** 1987. The avian influenza virus nucleoprotein gene and a specific constellation of avian and human virus polymerase genes each specify attenuation of avian-human influenza A/Pintail/79 reassortant viruses for monkeys. *J Virol* **61**:2857–2863.
 25. **Skehel JJ WD.** 2000. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annu Rev Biochem* **69**:531–569.
 26. **Rogers GN, Paulson JC.** 1983. Receptor determinants of human and animal influenza virus isolates: Differences in receptor specificity of the H3 hemagglutinin based on species of origin. *Virology* **127**:361–373.
 27. **Watanabe K, Handa H, Mizumoto K, Nagata K.** 1996. Mechanism for inhibition of influenza virus RNA polymerase activity by matrix protein. *J Virol* **70**:241–247.
 28. **Martin K, Helenius A** 1991. Nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins: The viral matrix protein (M1) promotes export and inhibits import. *Cell* **67**:117–130.
 29. **Watanabe K, Shimizu T, Noda S, Tsukahara F, Maru Y, Kobayashi N.** 2014. Nuclear export of the influenza virus ribonucleoprotein complex: Interaction of Hsc70 with viral proteins M1 and NS2. *FEBS Open Bio* **4**:683–688.
 30. **Lu Y, Wambach M, Katze MG, Krug RM.** 1995. Binding of the influenza virus NS1 protein to double-stranded RNA inhibits the activation of the protein kinase that phosphorylates the eIF-2 translation initiation factor. *Virology* **214**:222–228.
 31. **O'Neill RE, Talon J, Palese P.** 1998. The influenza virus NEP (NS2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteins. *EMBO J* **17**:288–

- 296.
32. **Murti KG, Webster RG, Jones IM.** 1988. Localization of RNA polymerases on influenza viral ribonucleoproteins by immunogold labeling. *Virology* **164**:562–566.
 33. **Honda A, Ueda K, Nagata K, Ishihama A.** 1988. RNA polymerase of influenza virus: role of NP in RNA chain elongation. *J Biochem* **104**:1021–1026.
 34. **Portela A, Digard P.** 2002. The influenza virus nucleoprotein: A multifunctional RNA-binding protein pivotal to virus replication. *J Gen Virol* **83**:723–734.
 35. **O'Neill RE, Jaskunas R, Blobel G, Palese P, Moroiaru J.** 1995. Nuclear Import of Influenza Virus RNA Can Be Mediated by Viral Nucleoprotein and for Protein Import. *J Biol Chem* **270**:22701–22704.
 36. **Poon LL, Pritlove DC, Fodor E, Brownlee GG.** 1999. Direct evidence that the poly(A) tail of influenza A virus mRNA is synthesized by reiterative copying of a U track in the virion RNA template. *J Virol* **73**:3473–3476.
 37. **Sugiyama K, Kawaguchi A, Okuwaki M, Nagata K.** 2015. pp32 and APRIL are host cell-derived regulators of influenza virus RNA synthesis from cRNA. *Elife* **4**:e08939.
 38. **Laskey RA, Honda BM, Mills AD, Finch JT.** 1978. Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers them to DNA. *Nature* **273**:415–420.
 39. **Ellis J.** 1987. Protein as molecular chaperones: *Nature* **328**:378–379.
 40. **Matsumoto K, Okuwaki M, Kawase H, Handa H, Hanaoka F, Nagata K.** 1995. Stimulation of DNA transcription by the replication factor from the adenovirus genome in a chromatin-like structure. *J Biol Chem.* **270**:9645–9650.
 41. **Kawase H, Okuwaki M, Miyaji M, Ohba R, Handa H, Ishimi Y, Fujii-Nakata T, Kikuchi A, Nagata K.** 1996. NAP-I is a functional homologue of TAF-I that is required for replication and transcription of the adenovirus genome in a chromatin-like structure. *Genes Cells* **1**:1045–1056.
 42. **Matsumoto K, Nagata K, Ui M, Hanaoka F.** 1993. Template activating factor I, a novel host factor required to stimulate the adenovirus core DNA

- p>replication.
- J Biol Chem*
- 268**
- :10582–10587.
43. **Nagata K, Kawase H, Handa H, Yano K, Yamasaki M, Ishimi Y, Okuda A, Kikuchi A, Matsumoto K.** 1995. Replication factor encoded by a putative oncogene, set, associated with myeloid leukemogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:4279–83.
 44. **Okuwaki M, Iwamatsu A, Tsujimoto M, Nagata K.** 2001. Identification of nucleophosmin/B23, an acidic nucleolar protein, as a stimulatory factor for in vitro replication of adenovirus DNA complexed with viral basic core proteins. *J Mol Biol* **311**:41–55.
 45. **Kato K, Miyaji-Yamaguchi M, Okuwaki M, Nagata K.** 2007. Histone acetylation-independent transcription stimulation by a histone chaperone. *Nucleic Acids Res* **35**:705–715.
 46. **Okuwaki M, Nagata K.** 1998. Template activating factor-I remodels the chromatin structure and stimulates transcription from the chromatin template. *J Biol Chem* **273**:34511–34518.
 47. **Janda M, Ahlquist P.** 1993. RNA-dependent replication, transcription, and persistence of brome mosaic virus RNA replicons in *S. cerevisiae*. *Cell* **72**:961–970.
 48. **Sakuragi S, Goto T, Sano K, Morikawa Y.** 2002. HIV type 1 Gag virus-like particle budding from spheroplasts of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:7956–61.
 49. **He F, Inoue M, Kigawa T, Takahashi M, Kuwasako K, Tsuda K, Kobayashi N, Terada T, Shirouzu M, Güntert P, Yokoyama S, Muto Y.** 2012. Solution structure of the splicing factor motif of the human Prp18 protein. *Proteins Struct Funct Bioinforma* **80**:968–974.
 50. **Horowitz DS, Lee EJ, Mabon SA, Misteli T.** 2002. A cyclophilin functions in pre-mRNA splicing. *EMBO J* **21**:470–480.
 51. **Crotti LB, Bačíková D, Horowitz DS.** 2007. The Prp18 protein stabilizes the interaction of both exons with the U5 snRNA during the second step of pre-mRNA splicing. *Genes Dev* **21**:1204–1216.
 52. **Horowitz DS, Abelson J.** 1993. A U5 small nuclear ribonucleoprotein particle protein involved only in the second step of pre-mRNA splicing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **13**:2959–2970.

53. **James SA, Turner W, Schwer B.** 2002. How Slu7 and Prp18 cooperate in the second step of yeast pre-mRNA splicing. *RNA* **8**:1068–1077.
54. **Bacíková D, Horowitz DS, Bac D.** 2005. Genetic and Functional Interaction of Evolutionarily Conserved Regions of the Prp18 Protein and the U5 snRNA. *Mol Cell Biol* **25**:2107–2116.
55. **Bilinovich SM, Davis CM, Morris DL, Ray LA, Prokop JW, Buchan GJ, Leeper TC.** 2014. The C-terminal domain of SRA1p has a fold more similar to PRP18 than to an RRM and does not directly bind to the SRA1 RNA STR7 region. *J Mol Biol* **426**:1753–1765.
56. **McKay DB, Xi L, Barthel KKB, Cech TR.** 2014. Structure and function of steroid receptor RNA activator protein, the proposed partner of SRA noncoding RNA. *J Mol Biol* **426**:1766–1785.
57. **Zhang X, Schwer B.** 1997. Functional and physical interaction between the yeast splicing factors Slu7 and Prp18. *Nucleic Acids Res* **25**:2146–2152.
58. **Kawaguchi A, Momose F, Nagata K.** 2011. Replication-coupled and host factor-mediated encapsidation of the influenza virus genome by viral nucleoprotein. *J Virol* **85**:6197–204.
59. **Chan AY, Vreede FT, Smith M, Engelhardt OG, Fodor E.** 2006. Influenza virus inhibits RNA polymerase II elongation. *Virology* **351**:210–217.
60. **Engelhardt OG, Fodor E.** 2006. Functional association between viral and cellular transcription during influenza virus infection. *Rev Med Virol* **16**:329–345.
61. **Engelhardt O, Smith M, Fodor E.** 2005. Association of the influenza A virus RNA-dependent RNA polymerase with cellular RNA polymerase II. *J Virol* **79**:5812–5818.
62. **Portela A, Digard P.** 2002. The influenza virus nucleoprotein : a multifunctional RNA-binding protein pivotal to virus replication. *J Gen Virol* **83**:723–734.
63. **Newcomb LL, Kuo RL, Ye Q, Jiang Y, Tao YJ, Krug RM.** 2009. Interaction of the influenza a virus nucleocapsid protein with the viral RNA polymerase potentiates unprimed viral RNA replication. *J Virol* **83**:29–36.
64. **Vreede FT, Jung TE, Brownlee GG.** 2004. Model suggesting that replication

- of influenza virus is regulated by stabilization of replicative intermediates. *J Virol* **78**:9568–72.
65. **Beaton AR, Krug RM.** 1986. Transcription antitermination during influenza viral template RNA synthesis requires the nucleocapsid protein and the absence of a 5' capped end. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**:6282–6286.
 66. **Jorba N, Coloma R, Ortín J.** 2009. Genetic trans-complementation establishes a new model for influenza virus RNA transcription and replication. *PLoS Pathog* **5**:e1000462.
 67. **Gerlach P, Malet H, Cusack S, Reguera J.** 2015. Structural insights into bunyavirus replication and its regulation by the vRNA promoter. *Cell* **161**:1267–1279.
 68. **Lanz RB, McKenna NJ, Onate S a, Albrecht U, Wong J, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW.** 1999. A steroid receptor coactivator, SRA, functions as an RNA and is present in an SRC-1 complex. *Cell* **97**:17–27.
 69. **Leygue E.** 2007. Steroid receptor RNA activator (SRA1): unusual bifaceted gene products with suspected relevance to breast cancer. *Nucl Recept Signal* **5**:e006.
 70. **Kielkopf CL, Lücke S, Green MR.** 2004. U2AF homology motifs: Protein recognition in the RRM world. *Genes Dev* **18**:1513–1526.

本研究で用いたプライマー一覧

Primer name	Sequence
EcoRI Prp18 for	5'-GCGCGGAATTCACCATGGACATTCTGAAAT-3'
Prp18 EcoRI 76 for	5'-GCGCGGAATTCATGACGCTTTCTAGGCAAG-3'
Prp18 EcoRI 76 for	5'-GCGCGGAATTCATGACGCTTTCTAGGCAAG-3'
Prp18 EcoRI 185 for	5'-GCGCGGAATTCATGGACATCATCACCAAAT-3'
Prp18 272 for	5'-GCGCGGAATTCATGGCCATTGGAAATG-3'
Prp18 78-123 for	5'-AAAATTACCTATGACGTTGAGGAATGATTG-3'
PA-664 for	5'-ATCACAGGAACAATGCGCAAGC-3'
NP PR8/WSN 400 for	5'-GACGATGCAACGGCTGGTCTG-3'
seg7 44-for	5'-GTCGAAACGTACGTTCTCTCTATC-3'
M2 mRNA for	5'-GAGGTCGAAACGCCTAT-3'
phrdR1.5f	5'-AACGGCTACCACATCCAAGG-3'
Prp18 DelC1 stop SacI rev	5'-CTCAGATATCTCGAGCTCACTTCACGTATTCTCTCTGC-3'
Prp18 DelC2 stop SacI rev	5'-CTCTAGATATCTCGAGCTCACTTCAGGAATTTGGTGAT-3'
Prp18 SacI XhoI rev end	5'-ATATCTCGAGCTCACAGTGCATTGTACTCC-3'
Prp18 78-123 rev	5'-CAAATCATTCCTCAACGTCATAGGTAATTTT-3'
PA-717 rev	5'-CGGTTCTGAATCCATCCACATAG-3'
NP-614rev	5'-AGCATTGTTCCAACCTCTTT-3'
Seg7-200 rev	5'-TCCCCTTAGTCAGAGGTGAC-3'
M2 mRNA rev	5'-CTCCAGCTCTATGTTGACAAA-3'
phrdR1.5r	5'-GGGAGTGGGTAATTTGCGC-3'

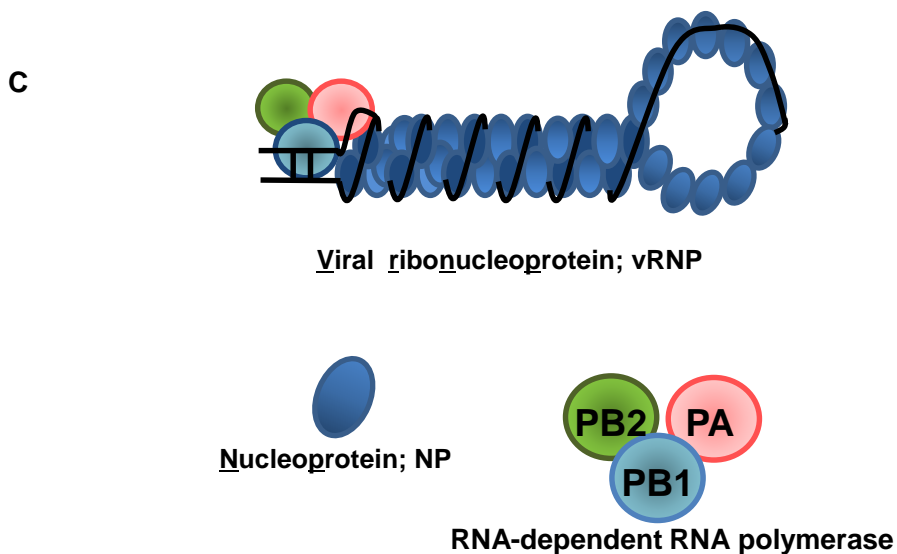
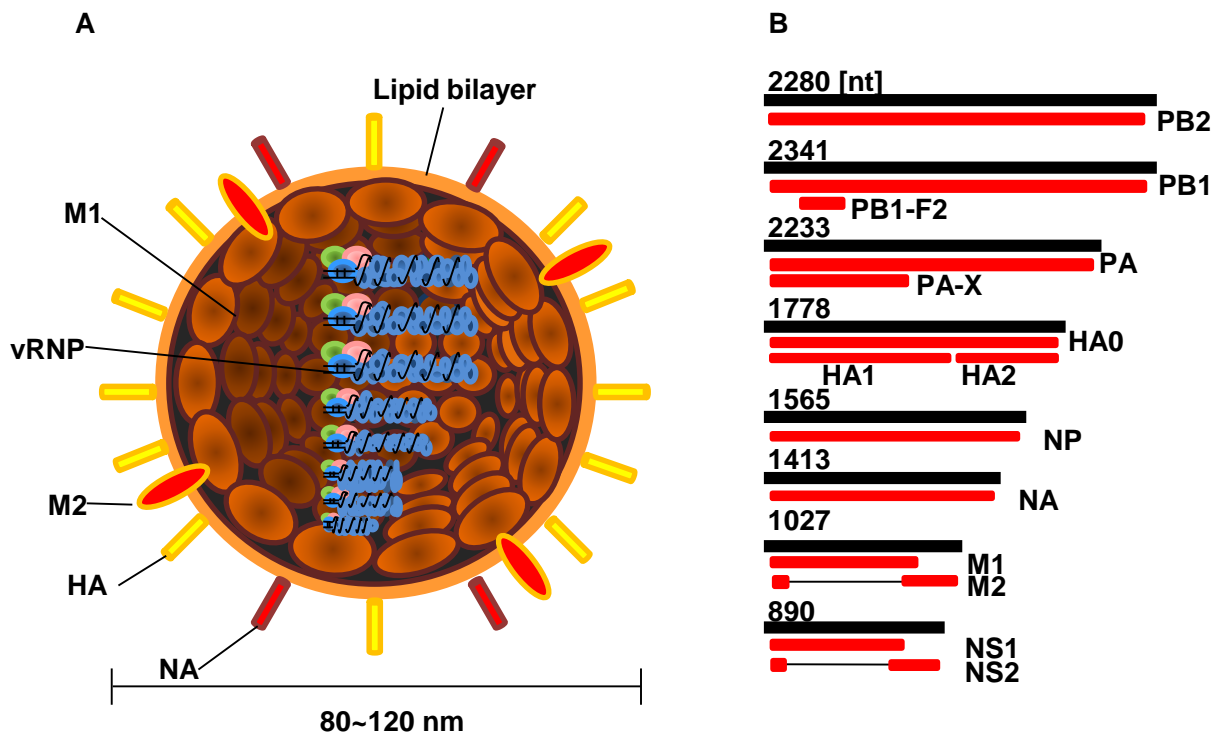


Figure 1 インフルエンザウイルスの構造

A) インフルエンザウイルス粒子の模式図。

B) インフルエンザウイルスゲノム各分節の模式図。

C) vRNPおよびその構成因子であるRNAポリメラーゼ複合体とNPの模式図。

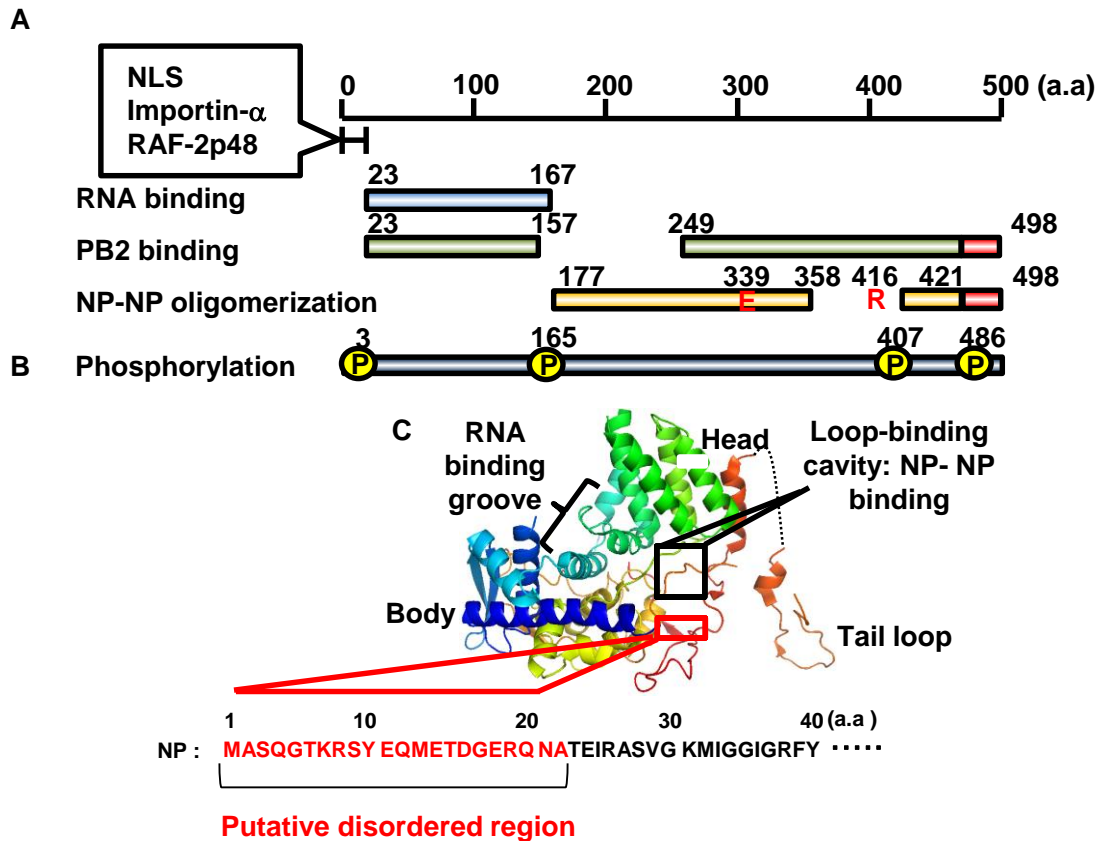


Figure 2 インフルエンザウイルスNPタンパク質の模式図

- A) NPのアミノ酸残基1～20番目の領域は、構造を持たない不規則領域 (Disordered region) であると推測されている。この領域は、核局在化シグナル(NLS)が存在し、Importin-αと結合することでvRNPの核内移行に関与する。また、RAF-2p48の結合部位であることも明らかになっている。
- B) NPのリン酸化部位が複数同定されており、リン酸化することでNP-NP結合が阻害され多量体化が抑制され単量体になる。
- C) NPのC末端に位置するTail loopは、pocket (Loop-binding cavity) を介してNP-NP結合を形成する。E339とR416は塩橋を形成しており、一アミノ酸変異でNPは単量体になる。NPの結晶構造は、Pymolを用いて作図した (Code: 2IQH)。

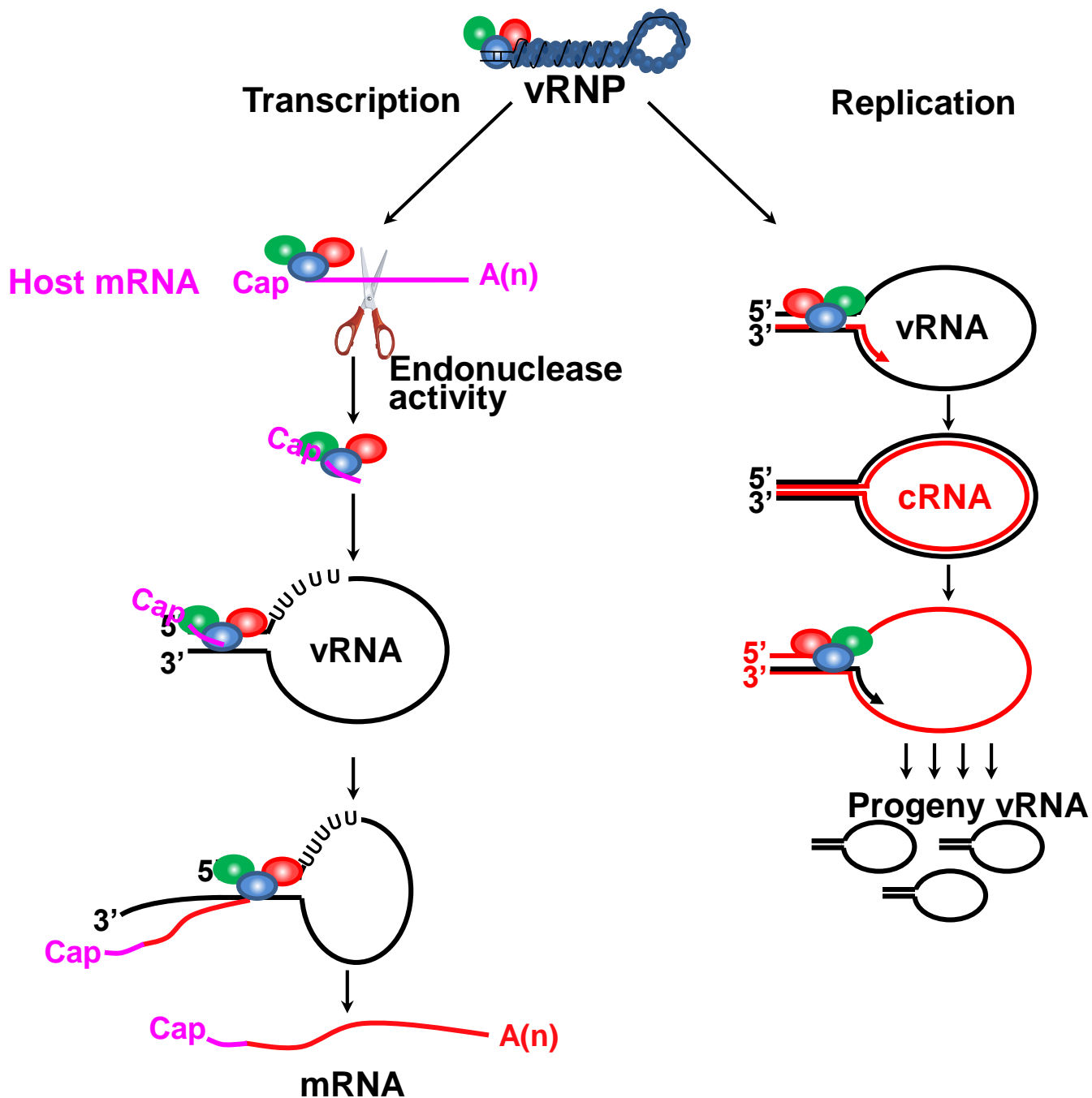


Figure 3 インフルエンザウイルスの転写および複製機構

転写反応では、インフルエンザウイルスポリメラーゼのサブユニットであるPB2が宿主mRNAと結合し、キャップ構造を含む5'末端10数塩基をPAサブユニットが切断し、これをプライマーとしてウイルスmRNAが合成される。伸長反応後、鋳型鎖の5'末端から15～22塩基内側に存在するU残基が連続した領域でポリメラーゼが鋳型上を滑り、ポリA鎖が付加される。

複製反応は2段階のRNA合成反応によってプライマー非依行的に行われる。第1段階は、vRNAから相補鎖であるcRNAを合成する過程であり、第2段階は、cRNAを鋳型にして子孫vRNAを増幅する過程である。

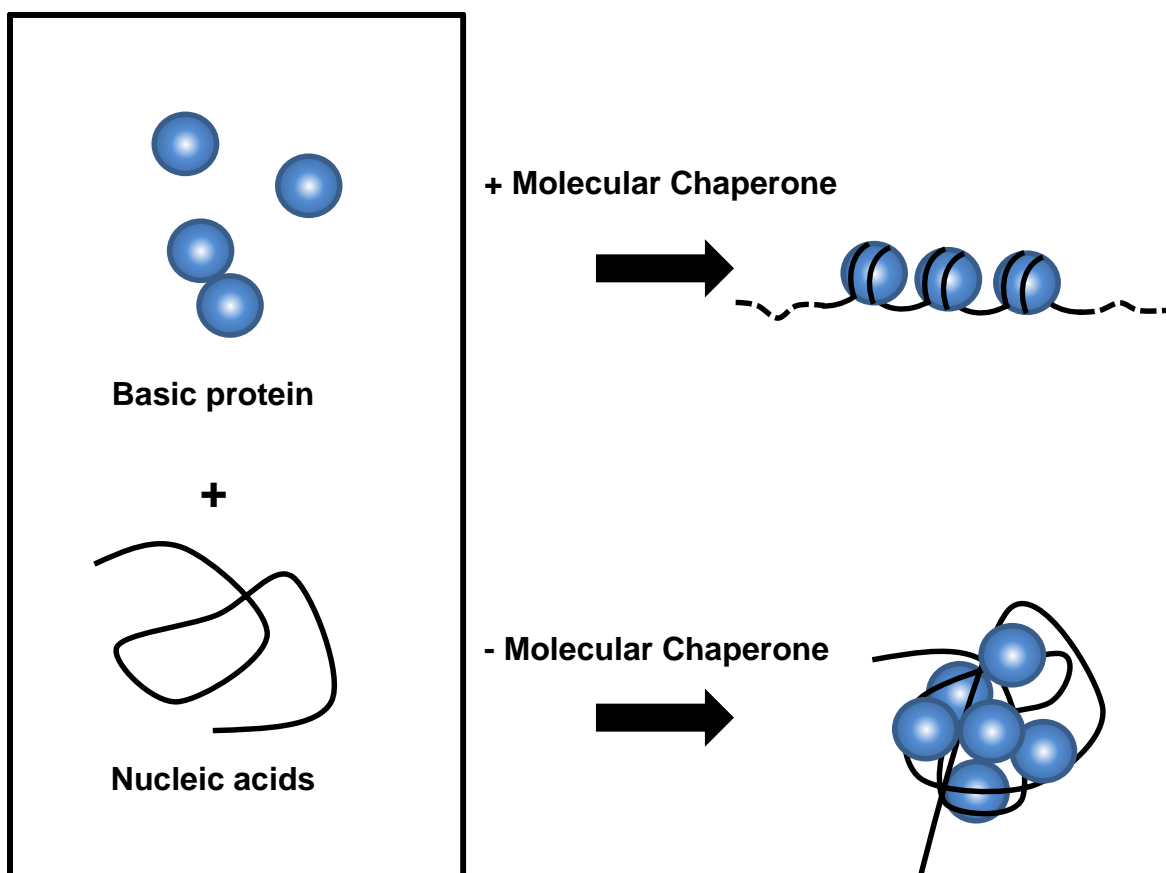


Figure 4 分子シャペロンによるタンパク質-核酸複合体形成

シャペロンの定義として、高次複合体形成を促進するが、自身は最終産物に含まれないという性質を持つ。

裸のゲノムをそのまま塩基性タンパク質と混合すると、凝集体を形成するが、シャペロン分子は塩基性タンパク質の余分な電荷を中和することで凝集体形成を抑制する。

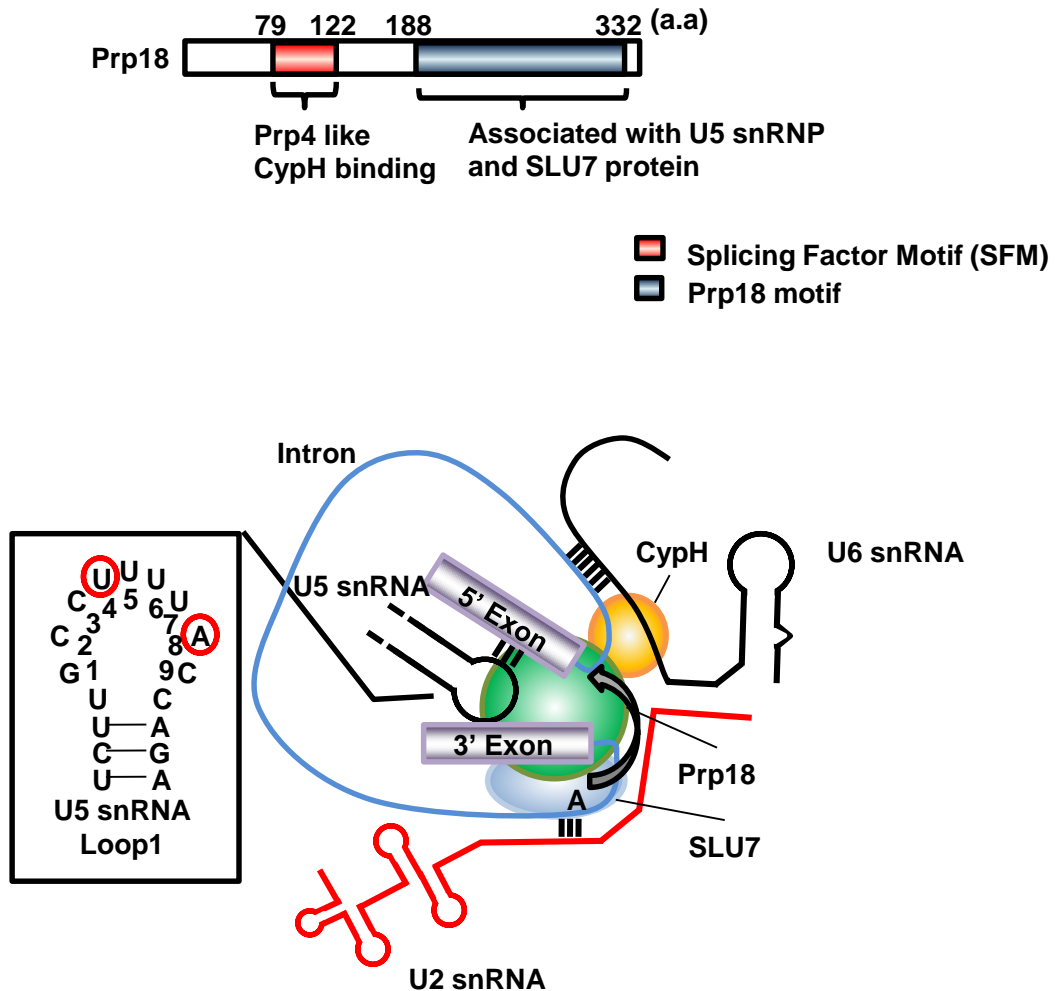


Figure 5 スプライシング反応におけるPrp18の機能

Prp18のN末端には、Prp18のオースログであるPrp4様ドメイン(SFM)が存在する。この部位を介して、CypHと特定のスプライシング因子との橋渡し役となり、スプライシング反応中のスプライソソーム構成タンパク質の再構成に関与しているのではないかと推測されている。Prp18のC末端には、種間で高度に保存されているPrp18 motifが存在する。この部位を介して、U5 snRNPおよびSLU7タンパク質と結合し、スプライシング反応を安定化させていると推測されている。酵母の生育試験の結果から、スプライシング反応においてU5 snRNAのA8およびU4が、Prp18と関与することが推測されている。

A

sp	Q9HD15	SRA1_HUMAN	---MTRCPAGQAEVEMAEIYKPGNKE--RGWINDPPQFSYGLQTQAGGP
sp	Q80VJ2	SRA1_MOUSE	---MMRCFAGGAEVEMAEIYKPGNKE--RGWINDPPQFSYGLQTQAGGP
sp	P33411	PRP18_YEAST	MDLDLASILKGEISKKKELANSKGVPPCTEKFOPHESANIDETPRQVE
sp	Q99633	PRP18_HUMAN	MDILKSEILKRQLVEDRNLLVENKKYFKRSELAKKEEAYFERCGYKIQ
			1 : : * . . : : .
sp	Q9HD15	SRA1_HUMAN	RRSLLTkRYAAP-----
sp	Q80VJ2	SRA1_MOUSE	KRTPLTKRYAAP-----
sp	P33411	PRP18_YEAST	QESTDEENLSDN-----
sp	Q99633	PRP18_HUMAN	PKEEDQKPLTSSNPVLELELAEEKLPMTLSRQEVIRRLRERGEPIRLFGE
			. : : :
			79
sp	Q9HD15	SRA1_HUMAN	QDGSPRPVPASETSPGPPPMGP-----PPPSKAPRSPVVGSGPAS
sp	Q80VJ2	SRA1_MOUSE	QDGSPRAPETS--GPPPYDH-----PPPSKASRPPPMGSCPAT
sp	P33411	PRP18_YEAST	QSDDIRTTISKLE-NRPERIQ-----EAIADQKTISYLIIDPSQIG
sp	Q99633	PRP18_HUMAN	TDYDAFQRLRKIEILTPEYNGLRNDLKAALDKIDQQYLNIEIVGGQEPGE
			. . . * . . .
			122
sp	Q9HD15	SRA1_HUMAN	GVEP-TSFPVESEAVMEDVLRP-----LE
sp	Q80VJ2	SRA1_MOUSE	GVEPSSPVIESETLIEDVLRP-----LE
sp	P33411	PRP18_YEAST	STEGKPLLSMKCNLYIHEILSR-----WK
sp	Q99633	PRP18_HUMAN	EDTQNDLKVHEENTTIEELEALGESLGKGDDHKMDIITKFLKFLGVWA
			: : : : :
			188
sp	Q9HD15	SRA1_HUMAN	QALED-----CRGHTRKQVCCDISRRLALLQEQWAGGKLSIPY
sp	Q80VJ2	SRA1_MOUSE	QALED-----CHGHTKKQVCCDISRRLALLQEQWAGGKLSIPY
sp	P33411	PRP18_YEAST	ASLEA-----YHPELFIDTKKALFPLLLQLRRNQLAPDLLISL
sp	Q99633	PRP18_HUMAN	KELNAREDYVKRSYQGLNSATQKQTESYLRLPLFRKLRLKRNLPADIKESI
			* : . . . : : * : : . : : .
sp	Q9HD15	SRA1_HUMAN	KKRMALLYQELSSHWDAAADDIHRSLMYDHVTEVSQWVMGVKRLIAEKRS
sp	Q80VJ2	SRA1_MOUSE	KKRMALLYQELHHQWDAADDIHRSLMYDHVTEVSQWVMGVKRLIAEKKS
sp	P33411	PRP18_YEAST	ATVLYHLQDPKEIN--LAVQSYMKLSIGNVAPWIGVTSYVGIHARSASKI
sp	Q99633	PRP18_HUMAN	TDITKFMLOREYVK--ANDAYLQMAIGNAPWIGVTMVGIIHARTGREKI
			: : * : : * : : : : * : : : : . . .
sp	Q9HD15	SRA1_HUMAN	LFSEEAAEEKSAATAEKNHTIPGFQOAS-----
sp	Q80VJ2	SRA1_MOUSE	LSSEETKEEK--FTVEPENQITIPGFQOFS-----
sp	P33411	PRP18_YEAST	QGGRNAANIMIDERTRLWITSIKRLITFEWYTSNHDLSA-----
sp	Q99633	PRP18_HUMAN	FS-KHYAHVNLDETGRKYIIGLKRMLTICQKHFTDPSPKCEYNAL
			. . . : : : : .
			332(a.a)

Amino acids sequence of Prp18 between yeast and human

Sequence similarities: 62%

— Prp18 motif

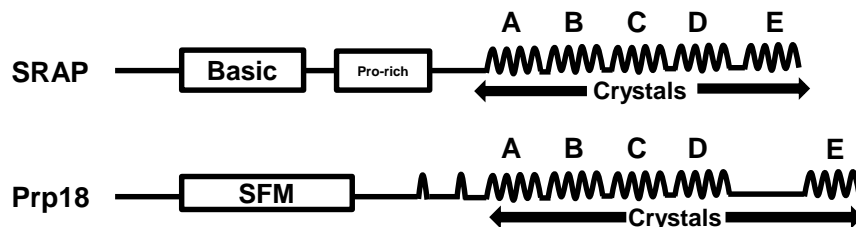
— Splicing factor motif (SFM)

* Exact match of amino acids sequence

: High similarity of amino acids sequence

. Low similarity of amino acids sequence

B



C

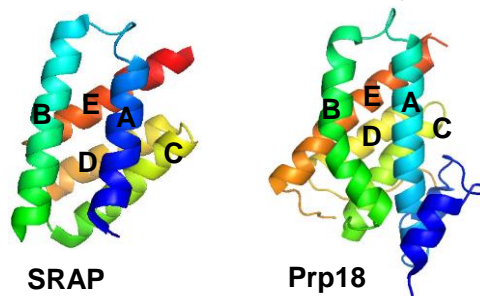


Figure 6 酵母およびヒト間のPrp18のホモロジーおよびsteroid receptor activator proein (SRAP)との構造類似性

- A) 酵母およびヒト間のPrp18のアミノ酸配列を比較すると、ホモロジーは低いがアミノ酸類似性が高いことが推測される。
- B) Prp18およびSRAPの二次構造の模式図を示す。二つのタンパク質は共通して5つのヘリックス構造を有しており、この構造はPrp18とSRAPのみで共通したモチーフである。
- C) SRAPとPrp18 motifの結晶構造は、Pymolで作図した(Code:4NBO, 1DVK)。

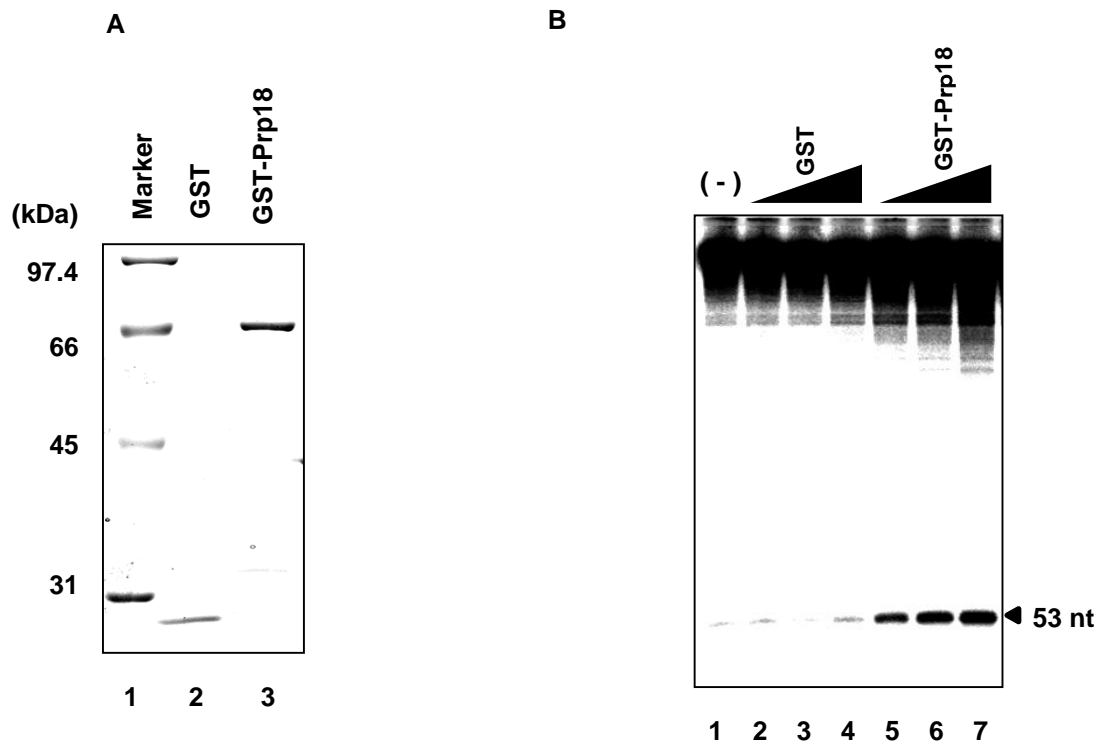
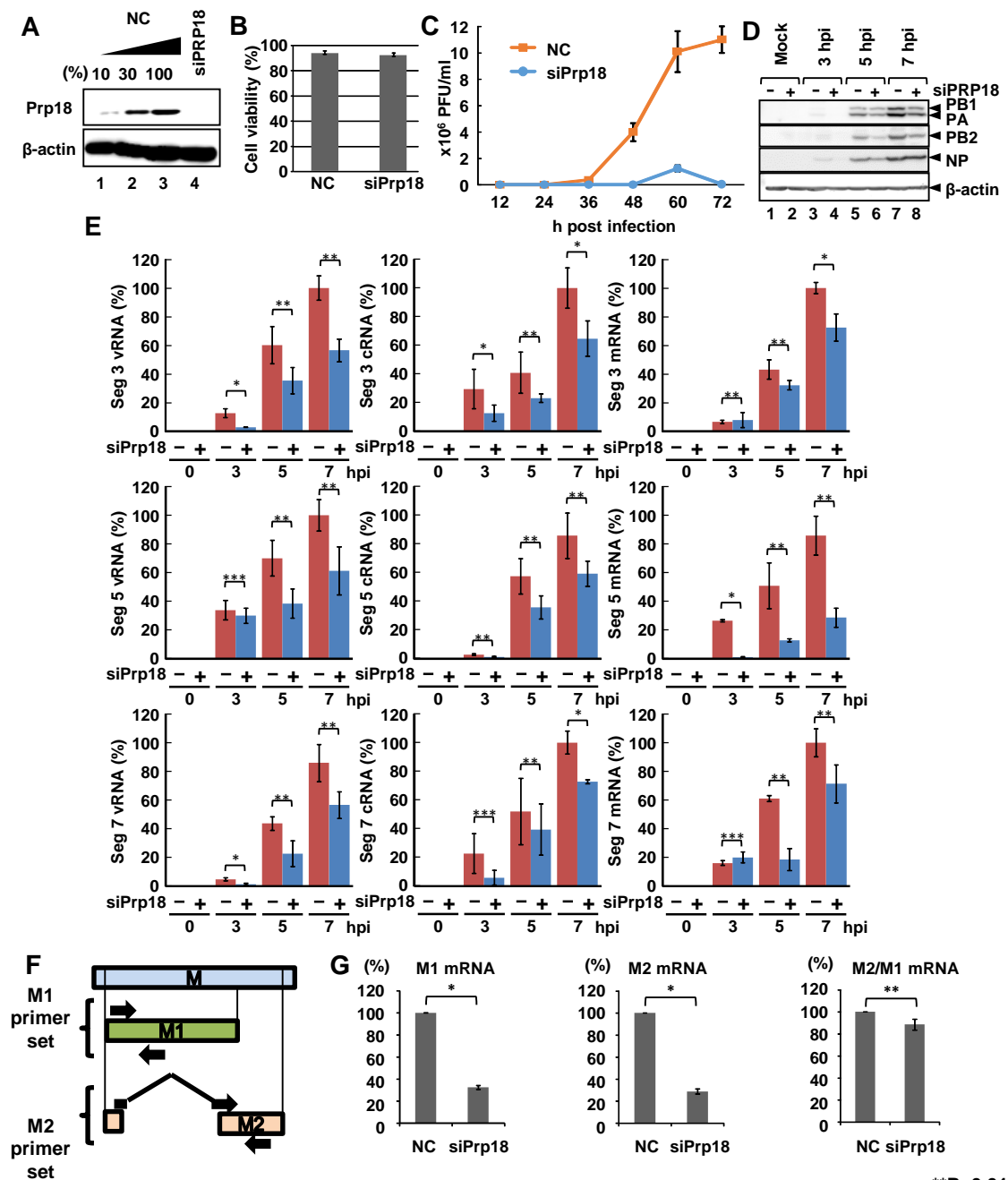


Figure 7 *in vitro* RNA合成系を用いたPrp18のRNA合成促進活性の検討

- A) 大腸菌発現系から精製したリコンビナントGSTタンパク質、GST-Prp18タンパク質をSDS-PAGEで展開後、CBB染色により精製タンパク質を検出した。
- B) vRNP複合体を酵素源とした*in vitro* RNA合成反応を行った。外来性鋳型に、53 merの人エインフルエンザウイルスゲノムを添加した。反応後、8M urea-10% PAGEで展開し、オートラジオグラフィーにより検出した。



**P<0.01, *P<0.05

Figure 8 Prp18ノックダウン細胞のインフルエンザウイルス感染への影響

- A) Prp18ノックダウン細胞内のendogenous Prp18タンパク質の検出。stealth siRNAをトランスフェクションし、endogenous Prp18タンパク質の発現量を抗Prp18抗体を用いたウエスタンブロッティング法で検討した。
- B) Prp18ノックダウン細胞の生存率の検討。トリパンブルー染色法により、Prp18ノックダウン細胞の生存率を確認した。
- C) siRNA ネガティブコントロール細胞とPrp18ノックダウン細胞におけるウイルス粒子産生量の比較。Prp18ノックダウン細胞にMOI=0.01でPR8株を感染させ、12、18、24、30、36、48、72時間のタイムコースで上清を回収しプラークアッセイを行った。
- D) 感染Negative control細胞および感染Prp18ノックダウン細胞内におけるウイルスタンパク質発現量の比較。Prp18ノックダウン細胞にMOI=3でPR8株を感染させ、3、5、7時間のタイムコースで感染細胞を回収し、抗ウイルスポリメラーゼ抗体、抗NP抗体および抗β-actin抗体を用いたウエスタンブロッティング法により各タンパク質を検出した。
- E) 感染タイムコースによるウイルスRNAの定量。Prp18ノックダウン細胞にMOI=3でPR8株を感染させ、3、5、7時間のタイムコースで感染細胞を回収し、total RNAを抽出後、定量的PCRにより各ウイルスゲノムを検出した。
- F, G) Prp18ノックダウン細胞におけるスプライシング反応への関与。Prp18ノックダウン細胞にMOI=3でPR8株を感染させ、回収した感染細胞からtotal RNAを抽出後、定量的PCRによりM1およびM2 mRNAを定量した。

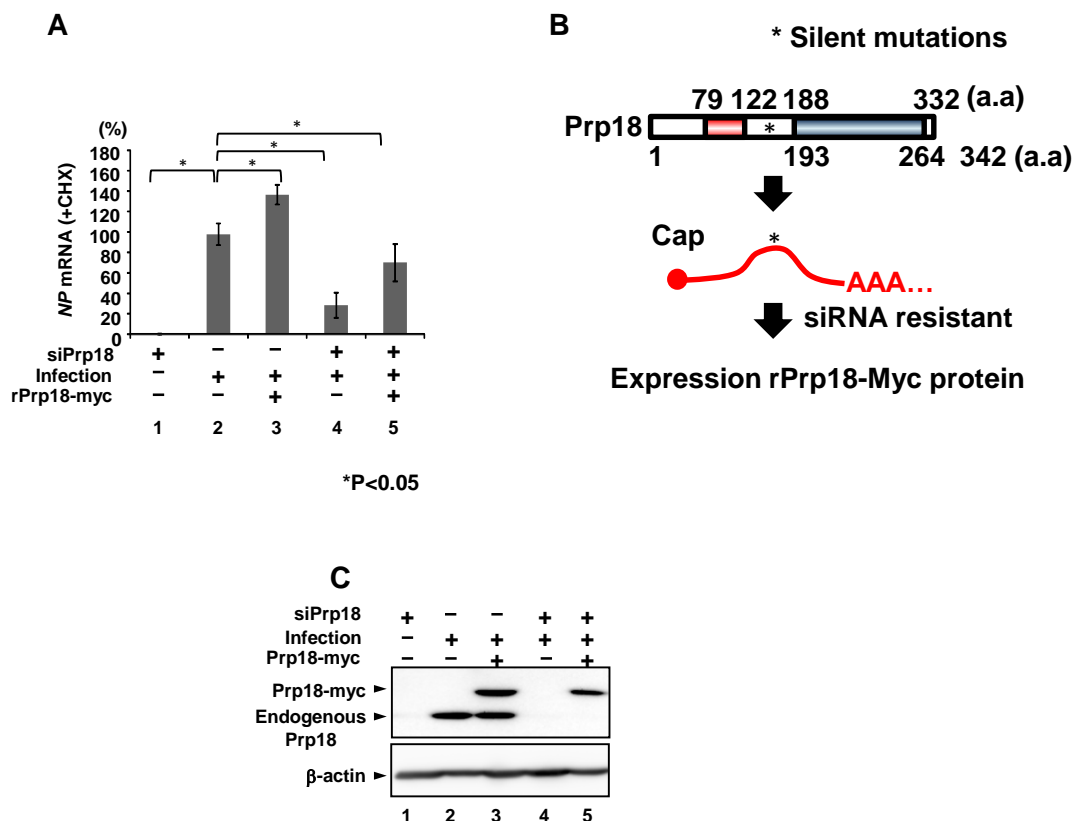


Figure 9 siRNA耐性Prp18遺伝子を用いたウイルスRNA合成活性のレスキュー試験

- A) Prp18ノックダウン細胞におけるウイルスmRNA合成量およびsiRNA耐性組換えPrp18タンパク質によるレスキュー試験。Prp18ノックダウン細胞にCHX存在下でPR8株をMOI=3で感染させ、感染4時間後に細胞を回収し、total RNAを抽出した。ついで、Oligo dTプライマーを用いたRT反応を行い、定量的PCRによりNP mRNAの定量実験を行った。
- B) siRNA耐性Prp18発現プラスミドの作製。
Prp18配列内にsiRNAの配列と相補しないようにサイレントミューテーションを導入した。
- C) 細胞内に発現しているendogenous Prp18およびsiRNA耐性組換えPrp18タンパク質の検出。抗Prp18抗体、抗β-actin抗体を用いたウエスタンブロッティング法により検出した。

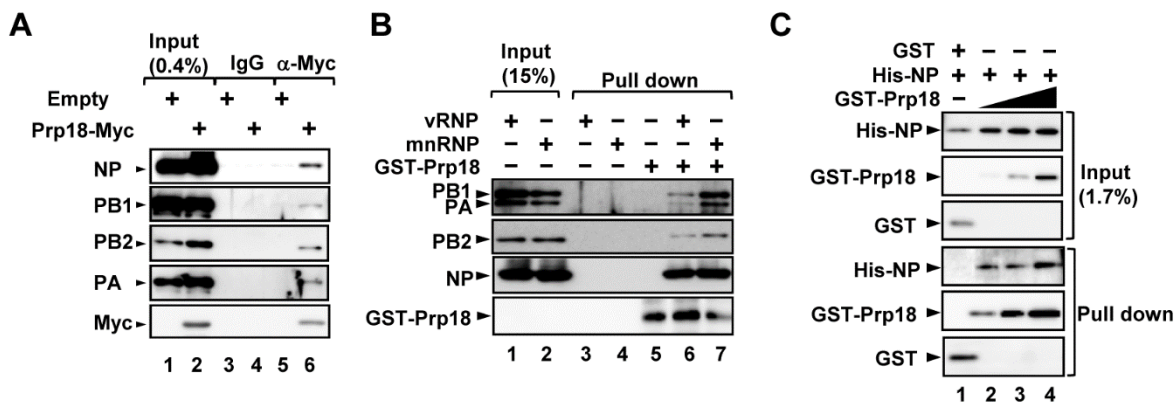


Figure 10 Prp18と相互作用するウイルス因子の同定

- A) Prp18-Myc過剰発現細胞を用いて感染操作し、細胞ライセートを用いて抗Myc抗体による免疫沈降法を行った。沈降産物は、抗NP抗体、抗PB1抗体、抗PB2抗体、抗PA抗体、および抗Myc抗体でウエスタンブロット法により検出した。
- B) vRNP複合体もしくはmnRNPとGST-Prp18によるGSTプルダウンアッセイを行った。プルダウン産物は、抗NP抗体、抗PB1抗体、抗PB2抗体、抗PA抗体、および抗GST抗体を用いたウエスタンブロット法により検出した。
- C) 大腸菌発現系により、組換えHis-NPタンパク質およびGST-Prp18タンパク質を精製し、GSTプルダウンアッセイを行った、プルダウン産物は、抗NP抗体および抗GST抗体を用いたウエスタンブロット法により検出した。

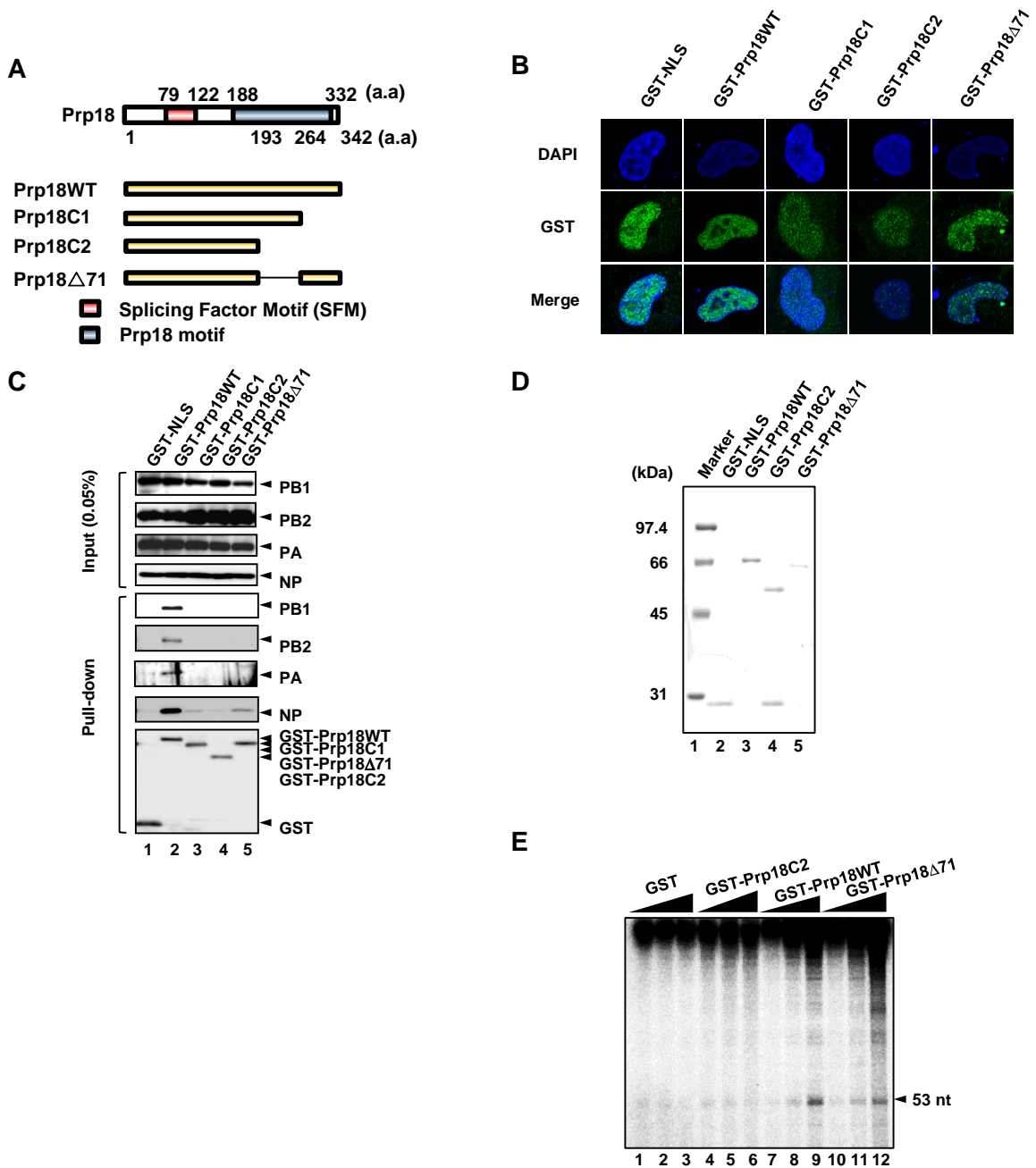


Figure 11 Prp18はNPを介してウイルスRNA合成を促進する

- A) Prp18欠損変異体の模式図。
- B) 各Prp18欠損変異体の核内移行の検討。HeLa細胞に各Prp18欠損変異体を遺伝子導入後、抗GST抗体を用いた免疫染色法により、局在を検討した。
- C) 各Prp18欠損変異体を過剰発現させた細胞に感染操作を行い(Pr8株、MOI=3)、感染6時間後に回収した細胞ライセートを用いてGSTプルダウンアッセイを行った。プルダウン産物は、抗ウイルスポリメラーゼ抗体、抗NP抗体、および抗GST抗体を用いたウェスタンブロット法により検出した。
- D) 大腸菌発現系により、Prp18欠損変異体を精製し、CBB染色法により検出した。
- E) GST-Prp18WTとGST-Prp18 Δ 71を添加した試験管内RNA合成反応実験。RNA合成産物は、フェノールクロロホルムおよびエタノール沈殿により精製し、変性ゲルで展開後、オートラジオグラフィーにより検出した。

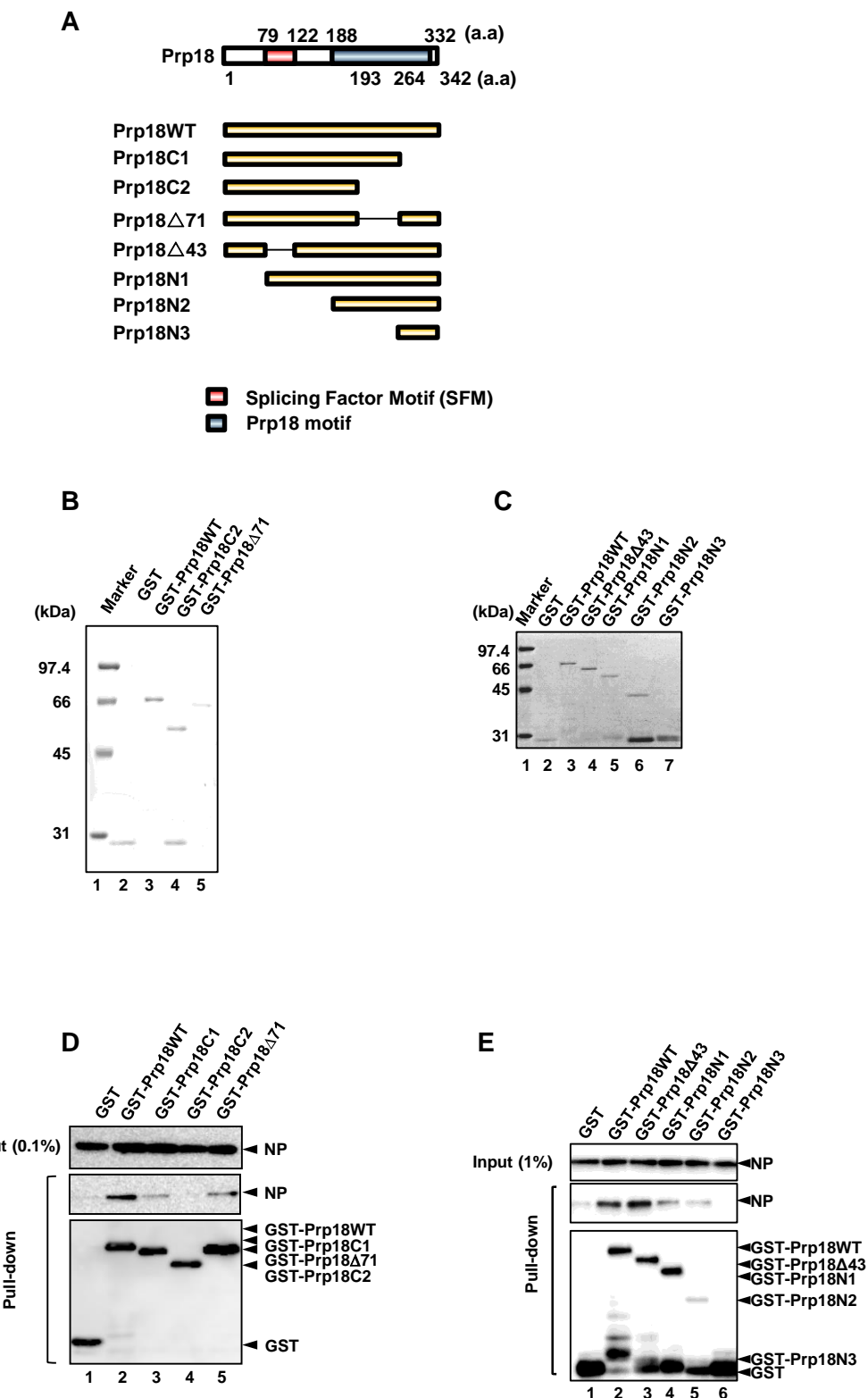


Figure 12 Prp18のNP認識部位

A) Prp18欠損変異体の模式図。

B, C) 大腸菌発現系により、Prp18欠損変異体を精製し、CBB染色法により検出した。

D, E) 各Prp18欠損変異体およびNPタンパク質過剰発現細胞ライセートを用いたGSTプルダウンアッセイを行った。プルダウン産物は、抗NP抗体および抗GST抗体を用いたウエスタンブロット法により検出した。

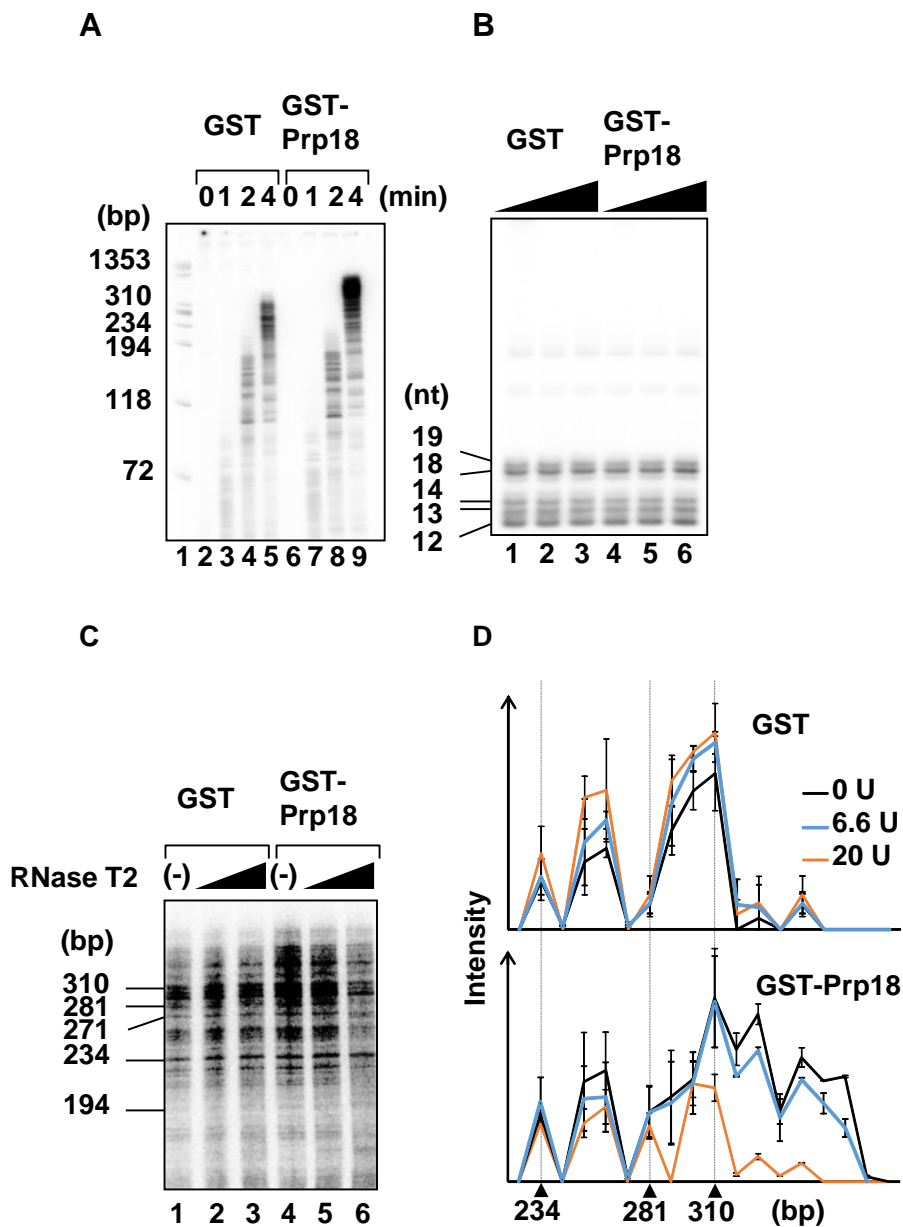


Figure 13 Prp18はウイルスRNA合成の伸長反応を促進する

- A) vRNPを酵素源とした試験管内RNA合成反応のタイムコースをとることで、Prp18によるRNA合成反応速度およびRNA合成の各素過程（開始、プロモーターからの離脱および伸長反応、終結、鋳型からのポリメラーゼの解離および再利用）への関与を検討した。
- B) 制限伸長反応により、RNA合成の開始効率を検討した。
- C) 試験管内RNA合成反応により得られた産物に、RNase T2を用いたRNase protection assayを行うことで、新規合成鎖と鋳型ウイルスゲノムとの相補鎖形成の有無を検討した。
- D) C)のバンドのintensityをImage Jにより測定し、グラフ化した。

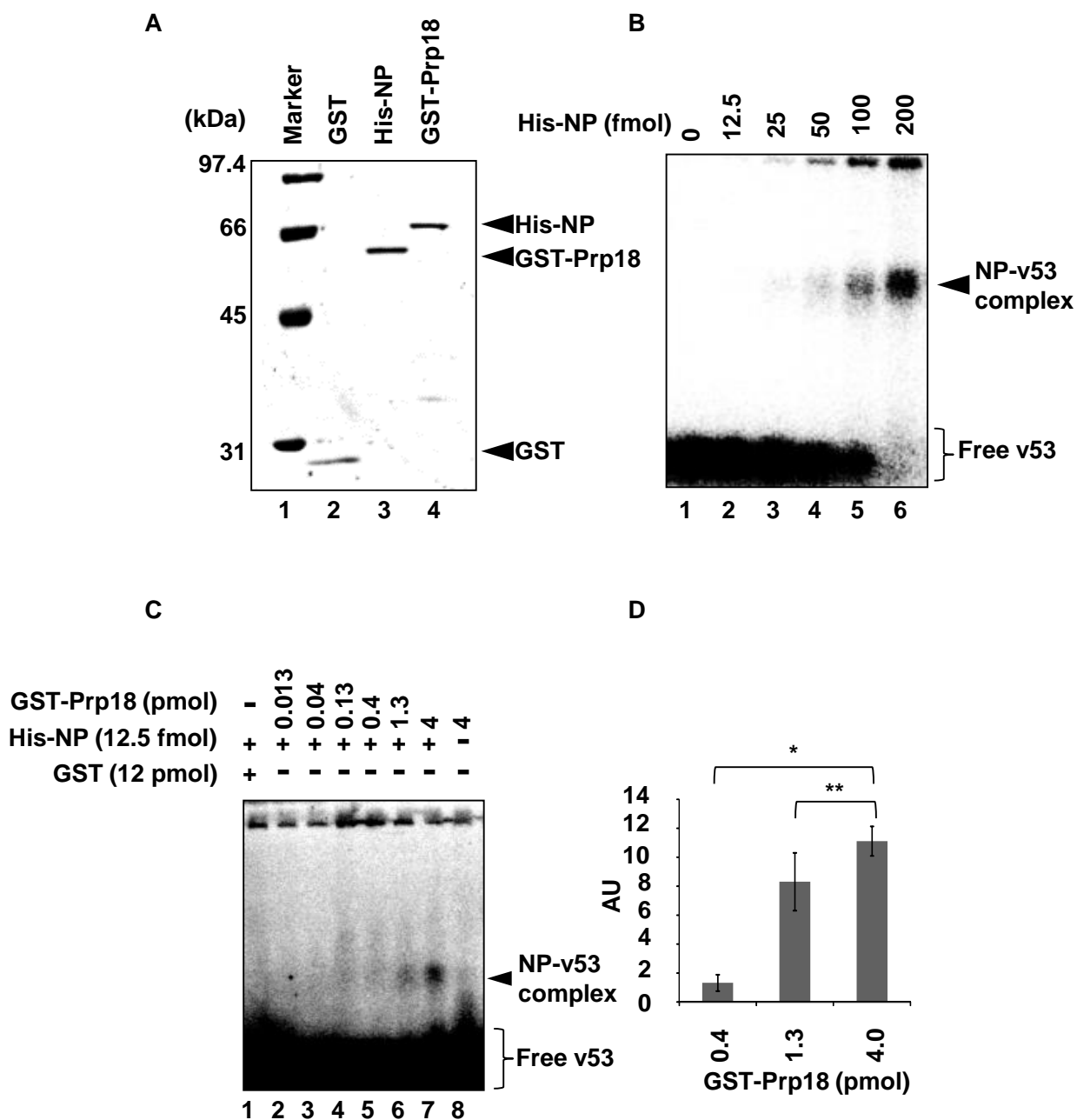


Figure 14 Prp18は分子シャペロンとしてNP-RNA複合体形成を促進する

- A) 大腸菌発現系から精製した組換えGSTタンパク質、His-NPおよびGST-Prp18タンパク質をSDS-PAGEで展開後、CBB染色により精製タンパク質を検出した。
- B) Prp18非存在下でNP-RNA凝集体を作製し、0.6%アガロースゲルで展開し、オートラジオグラフィーで検出した。
- C) Prp18-NP複合体を形成させた後、放射性ラベルv53を加えて0.6%アガロースゲルで展開し、オートラジオグラフィーで検出した。
- D) C) の実験結果のバンドのintensityをImage Jで測定し、グラフ化した。

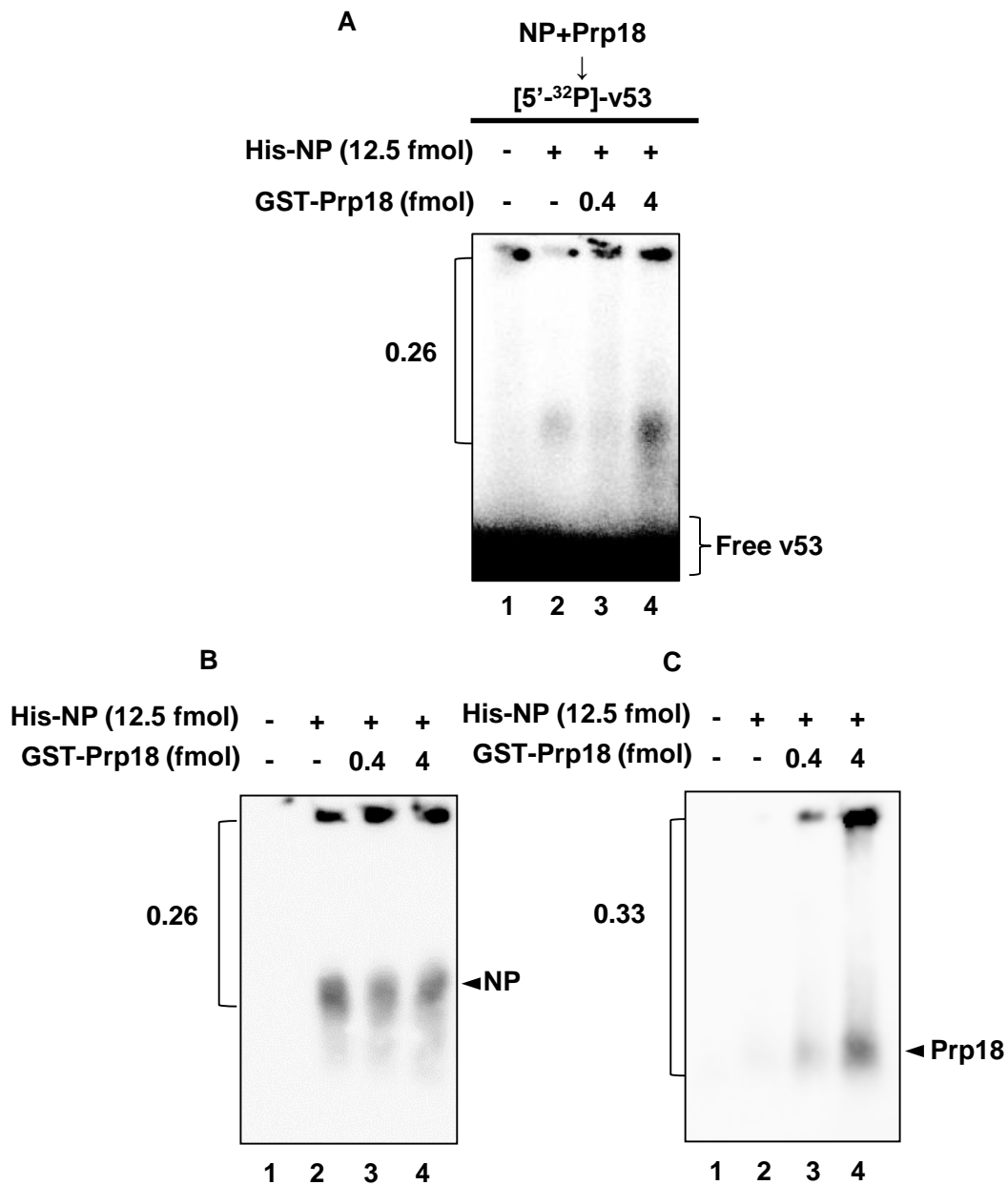


Figure 15 GST-Prp18のNPシャペロン活性の確認

GST-Prp18がNP-RNA複合体に含まれているか確認するため、ゲルシフトアッセイ後に

A) オートラジオグラフィー

B) 抗NP抗体を用いたウエスタンブロッティング法

C) 抗Prp18抗体を用いたウエスタンブロッティング法を行った。各バンドの位置は、相対移動度を示す。